

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Überersetzung der
europäischen Patentschrift
⑯ EP 0 684 954 B 1
⑯ DE 694 11 891 T 2

⑯ Int. Cl. 6:
C 07 H 21/00
C 12 Q 1/68

(2)

⑯ Deutsches Aktenzeichen: 694 11 891.5
⑯ PCT-Aktenzeichen: PCT/BE94/00013
⑯ Europäisches Aktenzeichen: 94 906 099.0
⑯ PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 94/19364
⑯ PCT-Anmeldetag: 18. 2. 94
⑯ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: 1. 9. 94
⑯ Erstveröffentlichung durch das EPA: 6. 12. 95
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 22. 7. 98
⑯ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 11. 3. 99

⑯ Unionspriorität: 9300160	19. 02. 93 BE
⑯ Patentinhaber: La Region Wallonne, Brüssel/Bruxelles, BE	
⑯ Vertreter: Glawe, Delfs, Moll & Partner, Patentanwälte, 80538 München	
⑯ Benannte Vertragstaaten: AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL	

⑯ Erfinder:
DE VOS, Marie-Joelle, B-7181 Feluy, BE; BOLLEN, Alex, B-1701 Itterbeek, BE

⑯ 5'(OH) UND/ODER 3'(OH) ZUR EINFÜHRUNG VON EINEM ODER MEHREREN NICHTRADIOAKTIVMARKIERTEN MARKERN CHEMISCH MODIFIZIERTE NUKLEINSÄURESONDEN, UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 11 891 T 2

07.10.68

94 906 099.0
La Region Wallonne

WM/fg

Beschreibung

Nukleinsäuresonden, die in 5' (OH) und/oder 3' (OH) chemisch modifiziert sind, um an diesen Stellen einen oder mehrere nichtradioaktive Marker einzuführen, und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft nichtradioaktive Nukleinsäuresonden und die für die Synthese dieser Sonden verwendbaren chemischen Verbindungen. Die Verwendung von Nukleinsäuresonden zum Detektieren und Diagnostizieren genetischer Erbkrankheiten, Onkogenen, viralen, bakteriellen oder parasitären Krankheiten setzt sich mehr und mehr durch und findet im klinischen, tiermedizinischen und Nahrungsmittelbereich Anwendung. Diese Sonden sind im allgemeinen ADN(DNS)- oder ARN(RNS)-Einzelstrang-Sequenzen, die in der Lage sind, unter bestimmten experimentellen Bedingungen ihre komplementären Sequenzen wiederzugewinnen und mit sich zu hybridisieren, um stabile Doppelstränge zu bilden.

Ursprünglich betraf das Nachweisverfahren für ADN-ADN- oder ADN-ARN-Hybride eine radioaktive Markierung: Die Sonde wurde mit einem Radioisotop markiert, am häufigsten mit ^{32}P , und der Nachweis nach der Hybridisierung erfolgte durch Auszählung oder Autoradiographie.

Bei den mit der Verwendung der Radioisotopen verbundenen Nachteilen (Halbwertszeiten, Kosten und Sicherheit) entwickelte sich mehr und mehr die Verwendung von "kalten" Sonden (die kein radioaktives Element enthalten). Die kalten Son-

07.10.96

den führten zu Nachweistechniken, die hauptsächlich enzymatische Systeme verwenden, die in Gegenwart eines Substrats zur Erzeugung einer Farbe führen und in den jüngsten Systemen zur Erzeugung von Licht (Fluoreszenz, Chemolumineszenz, Biolumineszenz).

Was die Markierung derartiger Sonden betrifft, können die Techniken, die veröffentlicht wurden, in zwei große Kategorien eingeteilt werden:

1. Die erste besteht aus dem Koppeln der Sonde an ein direkt detektierbares Element, zum Beispiel durch kovalente Kupplung eines Enzyms an die Sonde (alkalische Phosphatase, Peroxidase).
2. Die zweite Kategorie besteht im indirekten Nachweis des Hybrids. Um dies durchzuführen, bedient man sich Zwischenprodukten, die auf der Sonde fixierte Einheiten wiedererkennen. Es handelt sich hauptsächlich um Systeme, die auf der sehr starken Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin oder Streptavidin beruhen, wobei das Avidin oder das Streptavidin an ein Enzym konjugiert sind. Dieser Ansatz erfordert die Insertion eines oder mehrerer Biotine in die Nukleinsonde.

Die auf dem Einsatz kalter Sonden basierenden Techniken, die auf dem direkten oder indirekten Nachweis beruhen, benötigen daher auf der Sondenebene chemische Modifikationen in der Oligonukleotidkette, um ihre Markierung zu ermöglichen.

Die Oligodesoxyribonukleotide, die chemische Funktionen wie primäre Amine oder Thiole tragen, die die Kupplung mit variierenden Reagenzien ermöglichen, wurden in der Literatur

07.10.88

beschrieben. Die Einführung dieser Gruppen kann entweder über eine oder mehrere Basen oder eines der 5'- oder 3'-Enden des Oligodesoxyribonukleotids erfolgen. Chemische Modifikationen auf der Ebene der Basenkette haben den Nachteil, daß sie bei der Hybridisierung des Oligonukleotids mit den homologen Sequenzen mit den Basenpaarungen interferieren. Die Einführung funktioneller Gruppen in 5' oder 3' ist zu diesem Zweck sinnvoller, vorausgesetzt, daß die vorgeschlagene Technik es erlaubt, den detektierbaren Teil des Oligonukleotidabschnitts der derart hergestellten Sonde ausreichend zu verlängern.

Die Druckschrift "Nucleic Acids Research" (1990), 18 (15), 4345-4354, offenbart die Herstellung von Oligonukleotidsonden, die mehrere Marker in 5' (OH)-Position besitzen.

Die Marker werden durch Kondensation eines Phosphoramidits eingeführt, in dem sich die Dimethoxytrityl- und Phosphoramiditfunktionen an benachbarten Kohlenstoffatomen befinden. Die Phosphoramiditgruppierungen enthalten bereits den Marker.

Dieser Ansatz ermöglicht, abgesehen von der gleichen Oligonukleotidsynthese, weder die Herstellung mehrerer in verschiedener Art und Weise markierter Oligonukleotide, noch den Zugang zu einer großen Bandbreite von Nachweistypen.

Die Druckschrift sieht auch nicht die Möglichkeit voraus, die Empfindlichkeit des Nachweises der Sonden durch die Anzahl von Markern zu beeinflussen.

Die Druckschrift WO-A-9000622 offenbart Oligonukleotidhybridisierungssonden, für ihre Synthese verwendbare Zusam-

07.10.96

mensetzungen, genauso wie ein Syntheseverfahren für die Sonden. Nach dieser Druckschrift werden die 2n-Hydroxylgruppen bei 5' (OH) der Sonde erzeugt und dienen dazu, 2n-Carboxylsäurefunktionen zur Markierung der Sonde durch Chelatbildung mit Metallen der Lanthanidengruppe, zum Beispiel Europium, einzufügen. Die Druckschrift schließt ausdrücklich die Verwendung von Haptenen oder anderen Gruppen, in denen die Sichtbarmachung auf der starken Affinität zu anderen biologischen Produkten basiert, aus.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, Nukleinsäuresonden zu erhalten:

- die eine gute Hybridisierung mit den fraglichen komplementären Sequenzen eröffnen;
- die einen direkten oder indirekten Nachweis mit nichtradioaktiven Methoden und dies mit einer so niedrigen Nachweisgrenze wie möglich erlauben;
- die einfach herstellbar, d.h. für eine automatische oder manuelle Nukleinsäuresynthese, insbesondere auf einem festen Träger, geeignet sind.

Zu diesem Zweck betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuresonden zum Nachweis eines ADN- oder ARN-Moleküls, umfassend

- a) einen Oligonukleotid- oder Oligodesoxynukleotidteil, aufgebaut aus
S: einer ADN- oder ARN-Nukleinsäuresequenz, je nach dem nachzuweisenden Molekültyp, und
- b) einen nichtnukleotiden Teil, der chemische Eigenschaften besitzt, die die direkte oder indirekte Fixierung

07.10.86

eines oder mehrerer Nachweiseinheiten oder Marker M ermöglichen, die nichtisotopisch durch die Erzeugung von Färbung oder Licht nachweisbar sind,

dadurch gekennzeichnet, daß der Teil b) gebildet ist von einer Kette aus Phosphateinheiten, die von Alkyleinheiten unterbrochenen sind, nämlich

b1) bestimmten Alkyleinheiten, die die verschiedenen Phosphatgruppen verbinden und keine besondere Funktionalität zeigen,

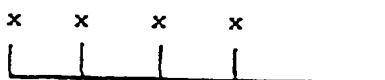
b2) primäre Aminfunktionen aufweisende Alkyleinheiten, die die Kupplung mit verschiedenen Reagenzien erlauben, um den Nachweis auf direkte oder indirekte Art und Weise zu ermöglichen,

wobei die Einheiten b2) über die Zwischeneinheiten b1) mit dem Teil a) oder der Sequenz S verbunden sind.

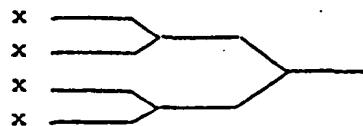
Erfindungsgemäß ist die Sequenz S mit ihrem 5'- und/oder 3'-Ende an einen oder mehrere Marker M gebunden.

Der molekulare Aufbau, der die chemischen Funktionen X besitzt, der die direkte oder indirekte Fixierung eines oder mehrerer Nachweiseinheiten ermöglicht, kann unter anderem zwei Strukturtypen darstellen:

- eine Struktur in Form eines "Kamms", wo die chemischen Funktionen X auf einer linearen Kette angeordnet sind:



- eine Struktur in Form eines "Kandelabers", wo die chemischen Funktionen X auf einer verzweigten Kette angeordnet sind:



Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit diesen beiden Strukturtypen.

I. In 5' (OH) und (oder) in 3' (OH) chemisch modifizierte Nukleinsäuresonden mit einem molekularen Aufbau in Form eines "Kamms".

In derartigen Sonden besteht der Nukleotidteil aus einer bestimmten und zu einem komplementären Zielfragment homologen Nukleinsäuresequenz, die die Stabilisierungsenergie liefert und die Hybridisierung mit dem nachzuweisenden ADN- oder ARN-Molekül sicherstellt. Sie ist aus einer Kette von Phosphateinheiten aufgebaut, die von Riboseeinheiten unterbrochen werden.

Der nichtnukleotide Teil, der die den direkten oder indirekten Nachweis des Hybrids ermögliche Reaktivität liefert, der geeigneterweise am 5' (OH) - und/oder 3' (OH) -Ende der oben beschriebenen Nukleinsäuresequenz eingeführt werden kann, ist aus einer linearen Kette von Phosphateinheiten aufgebaut, die von Alkyleinheiten unterbrochen werden, nämlich

L: bestimmte Alkyleinheiten zeigen keinerlei besondere chemische Funktionalität; die Wirkung derartiger Einheiten,

07.10.68

auch als "chemische Zweige" bezeichnet, besteht in der Einführung von Zwischenräumen zwischen den Nachweiseinheiten;

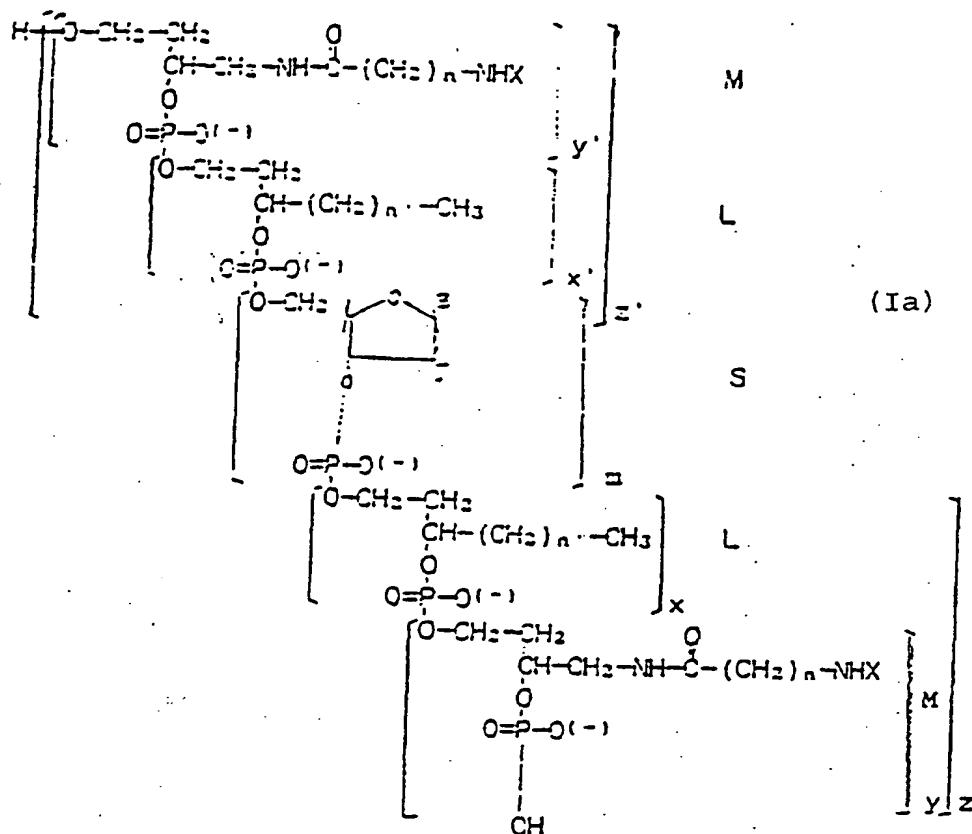
M: bestimmte Alkyleinheiten zeigen primäre Aminfunktionen, die die Kupplung mit variierenden Reagenzien ermöglichen, um zur Bildung von direkten oder indirekten Nachweiseinheiten zu führen.

Die Einheiten M sind voneinander durch eine Zahl variabler chemischer Zweige L getrennt. M trägt ein synthetisches oder natürliches Molekül, das direkt oder indirekt auf nichtisotopische Art und Weise detektierbar ist. Eine derart aufgebaute Sonde entspricht der allgemeinen Formel:

$$[(M)y'-(L)x]z' - S - [(L)x-(M)y]z \quad (I)$$

in der S, L und M die oben angegebenen Bedeutungen haben, x , x' , z , z' Zahlen gleich oder größer 0 sind, mit der Einschränkung, daß z und z' nicht gleichzeitig 0 sind, und y und y' Zahlen größer 0 sind. Die chemische Modifikation erfolgt also in 5' und/oder 3' der Nukleinsäuresequenz derart, daß man die Formel I in folgender Art und Weise im einzelnen darstellen kann:

07.10.96



Man kann die Einheiten S, L und M in folgender Art und Weise beschreiben:

S: Nukleinsäuresequenz,

J = H oder OH,

m stellt die Zahl der Nukleotide von 1 bis 1000 dar,

B: Nuklein-, Purin- oder Pyrimidinsäurebase, je nach den Nukleotiden veränderbar.

Man erinnere sich, daß die Nukleinsäuren Nukleotidpolymere sind, im Falle des ARN Ribonukleotidpolymere, im Falle des ADN Desoxyribonukleotidpolymere. Die Monomeren, d.h. die Nukleotide, sind im Falle von ARN aus Phosphorsäure, einer

Ose mit 5 Kohlenstoffatomen, der Ribose ($J=OH$) und einer der vier grundlegenden Basen: Adenin, Guanin, Cytosin, Uridin, aufgebaut. Seltener trifft man auf sog. weniger wichtige Basen oder Nukleoside, wie die methylierten oder hydroxylierten Basen, das Dihydouracil und das Pseudouridin. Im Falle von ADN ist die Ose der Desoxyribonukleotide die D-2-Desoxyribose ($J=H$) und die vier hauptsächlichen Basen sind Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin; in selteneren Fällen wird das Cytosin durch das Methylcytosin oder das Hydroxymethylcytosin ersetzt. Eines der wesentlichen Charakteristika der Polynukleotide ist die Internukleotid-3'-5'-Phosphodiesterbindung.

L: Chemischer Zweig,
 $x, x' = 0$ bis 100,
 $n' = 0$ bis 20.

Der chemische Zweig ist ein nichtnukleotides Polymer. Eines der wesentlichen Charakteristika dieses Polymers ist, ganz wie für ADN und ARN, die Phosphodiesterbindung, die die Monomeren verbindet.

Das Monomere wird aufgebaut durch Phosphorsäure und ein Diol: das Propan-1,3-diol, substituiert am Kohlenstoff 1 durch eine Alkylseitenkette.

M: Marker,
 $y, y' = 1$ bis 100,
 $n = 2$ bis 20.

X: Marker, entweder direkt: alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluorescein, jedes Enzym, das in der Lage ist, in Gegenwart eines Substrats eine Färbung oder Licht zu

07.10.96

erzeugen; oder indirekt: Biotin, Digoxigenin, jedes Hapten, das durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkennbar ist.

Der Marker ist ein nichtnukleotides Polymer. Eines der wesentlichsten Charakteristika dieses Polymers ist, ganz wie für ADN und ARN, die Phosphodiesterbindung zwischen den Monomeren.

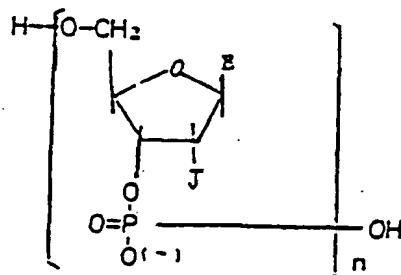
Das Monomer wird aufgebaut durch Phosphorsäure und ein Diol: das Propan-1,3-diol, substituiert am Kohlenstoff 1 durch ein Methylenacetamidoalkan, wobei die Alkylkette an der Endposition durch ein den Marker tragendes Amin funktionalisiert ist.

Schließlich kann das für den Nachweis der Sonde verantwortliche Element LM in 5' (OH) für $z' \neq 0$; $z = 0$ oder in 3' (OH) für $z' = 0$; $z \neq 0$ und gleichzeitig in 5' (OH) und in 3' (OH) für $z' \neq 0$; $z \neq 0$, wobei z und z' im allgemeinen = 0 bis 100 sind, eingeführt werden.

Die Herstellung der Verbindung Ia kann demnach durch klassische Internukleotidsynthese durchgeführt werden, da die verschiedenen Elemente von I, nämlich S, L und M, Polymere sind, von denen die Monomere untereinander durch Phosphodiesterbindungen verbunden sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von Sonden der Formel Ia, umfassend

A1) die Synthese einer Nukleinsäuresequenz S



durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger,

und

A2) die Fixierung eines Markers,

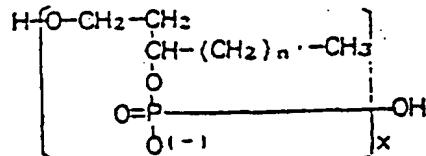
dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz, vorzugsweise nach demselben Syntheseverfahren, insbesondere auf einem festen Träger,

entweder einer Verlängerung an ihrem 5' (OH)-Ende durch eine Reihe von Einheiten M und L

oder einer Verlängerung an ihrem 3' (OH)-Ende durch eine Reihe von Einheiten M und L

oder einer Verlängerung an ihrem 5' (OH)- und ihrem 3' (OH)-Ende durch zwei Reihen von Einheiten M und L,
unterzogen wird,

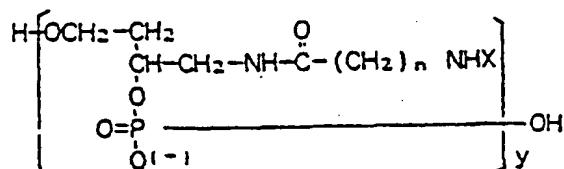
B) die Einheiten L durch Synthese eines nichtnukleotiden Polymers L



erhalten werden, wobei n' und x die zuvor angegebene Bedeutung haben,

07.10.86

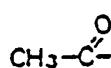
C) die Einheiten M durch Synthese eines nichtnukleotiden Polymers M



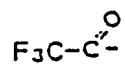
erhalten werden, wobei n und y die zuvor angebene Bedeutung haben,

und

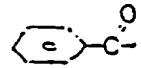
X entweder einen Marker: wie alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluorescein, Biotin, Digoxigenin, jedes Hapten, das durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkennbar ist, oder eine Übergangsschutzgruppe für die primäre Aminfunktion, die nach der Gesamtsynthese der Nukleinsäuresonde entfernt wird. Beispielsweise kann x in diesem Syntheseansatz ein Acetyl (VI), ein Trifluoracetyl (VII) oder ein Benzoyl (VIII) darstellen:



VI



VII

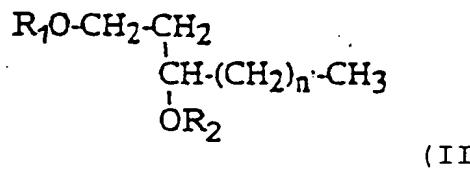


VIII

und die obigen Synthesen B und C werden insbesondere auch durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger, durchgeführt.

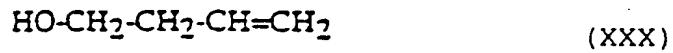
Insbesondere wird jedes Element des chemischen Zweigs L durch Kondensation einer Verbindung der Formel,

07.10.86



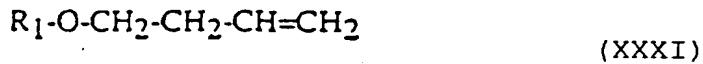
am Ende eines Nukleotids oder schon am Ende eines bereits vorhandenen Synthons eingeführt, worin R_1 und R_2 wie nachfolgend definiert sind.

Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung wird jeder Marker oder jede Nachweiseinheit M erhalten, ausgehend von 3-Buten-1-ol der Formel



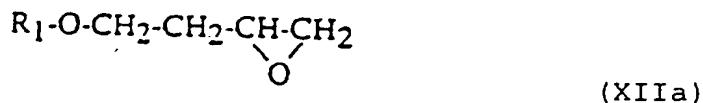
durch die Schritte:

a) Schutz der primären Alkoholfunktion mittels einer Schutzgruppe R_1 , um eine Verbindung der Formel



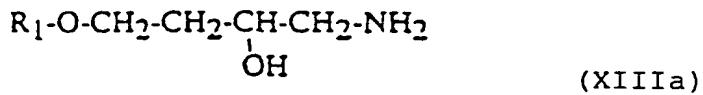
zu erhalten,

b) Epoxidierung der Doppelbindung der Verbindung (XXXI), um eine Verbindung der Formel



zu bilden,

c) Öffnen des Epoxids mit Ammoniak, um eine Verbindung der Formel



07.10.96

zu bilden,

d) Schutz der primären Amingruppe einer Verbindung der Formel



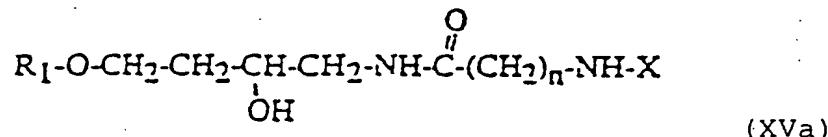
um eine Verbindung der Formel



zu bilden, worin X die zuvor angegebene Bedeutung hat,

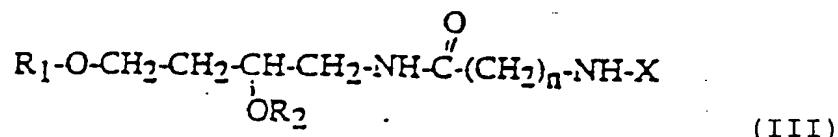
e) Aktivierung der Verbindung (XXXIII),

f) Kondensation der Verbindungen (XIIa) und (XXXIII) miteinander, um eine Verbindung der Formel



zu bilden, und

g) Phosphorylierung der Verbindung (XVa), um eine Verbindung der Formel

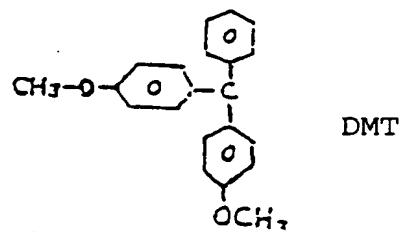


zu bilden.

In den vorgenannten Formeln ist R_1 eine Schutzgruppe mit primärer Alkoholfunktion; beispielsweise kann R_1 im Falle der Synthese mit Phosphoramiditen auf einem festen Träger

07.10.86

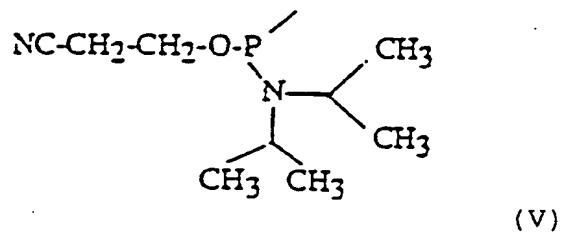
die Gruppe 4,4'-Dimethoxytrityl der Formel IV (DMT) darstellen, die im sauren Milieu instabil ist



und

R_2 H oder jede gegebenenfalls geschützte phosphorylierte Gruppe, die geeignet ist, das Synthon II oder III am 5'-Ende eines Nukleotids oder eines Synthons einzuführen, das durch einen vorgegebenen Typ der Internukleotidverbindungs-synthese bereits auf dem festen Träger kondensiert ist.

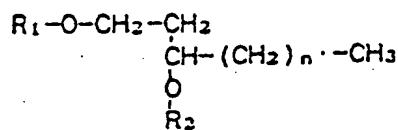
R_2 kann beispielsweise im Falle der Synthese mit Phosphoramiditen auf einem festen Träger eine Cyanoethoxydiisopropylaminophosphoramidit-Gruppe der Formel V darstellen.



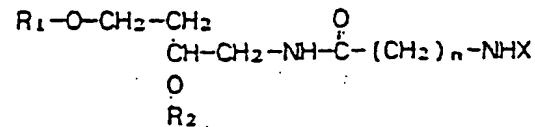
Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls zwei synthetische nichtnukleotide Verbindungen, die jeweils als Zwischenprodukte für die Synthese der Fragmente M und L der Verbindung Ia für jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger, verwendbar sind. Die beiden bean-

07.10.96

spruchten synthetischen Verbindungen sind durch die Formeln II und III dargestellt



(II)

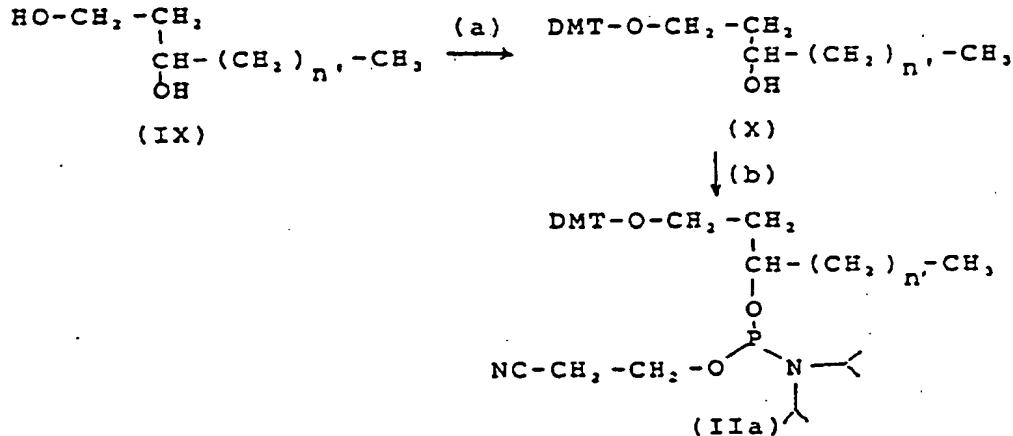


(III)

in denen R_1 , R_2 , n , n' und X die zuvor angegebene Bedeutung haben.

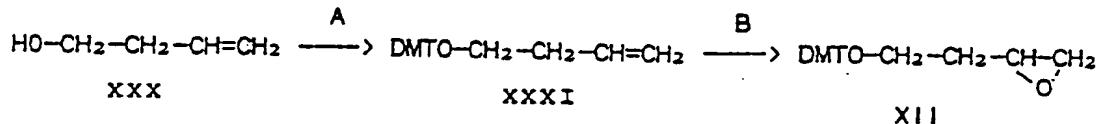
Die Erfindung betrifft ebenfalls die Herstellung der Zwischenverbindungen II und III durch die oben beschriebenen Verfahren.

Im Falle der Synthese der Phosphoramidite kann die Synthese der Verbindungen II durch das nachfolgende Schema dargestellt werden:

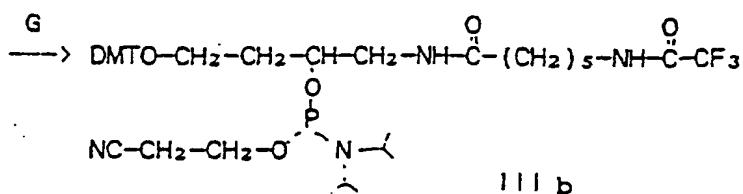
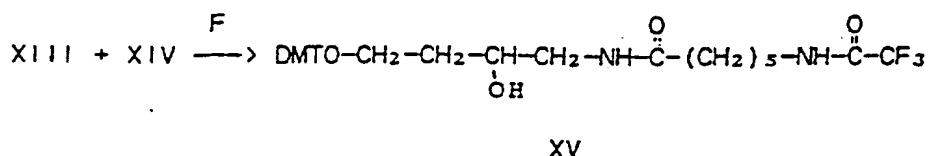
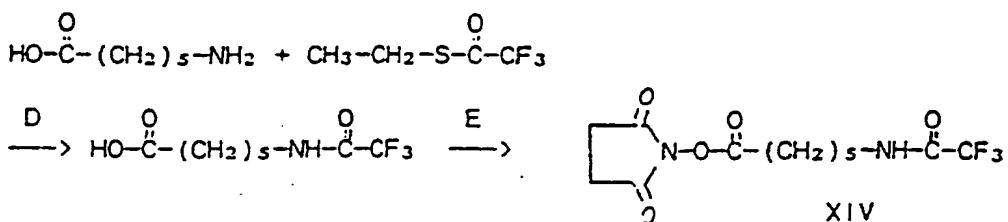
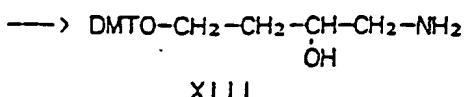


07.10.68

In gleicher Weise kann im Falle einer Synthese von Phosphoramiditen das Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel III durch das Schema unten dargestellt werden:



C



Schritt A) Schutz des primären Alkohols Buten-3-ol mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid;

Schritt B) Epoxidierung der Doppelbindung mit m-Chlorperbenzoësäure;

Schritt C) Öffnung des Epoxids mit Ammoniak, um zur Verbindung XIII zu führen;

07.10.88

Schritt D) Schutz des primären Amins der 6-Aminocapronsäure mit einer Trifluoracetylgruppe;

Schritt E) Aktivierung der 6-Trifluoracetylaminocapronsäure durch das N-Hydroxysuccinimid, um zu Verbindung XIV zu führen;

Schritt F) Herstellung der Verbindung XV durch Kondensation zwischen XIII und XIV;

Schritt G) Phosphorylierung des sekundären Alkohols XV mit einem Reagens, das die weitere Kupplung in fester Phase des durch eine Internukleotidverbindungssynthese erhaltenen Derivats III ermöglicht. Die Phosphorylierung im Fall der Synthese der Phosphoamidite kann mit dem Diisopropylaminocyanoethoxychlorophosphin XI durchgeführt werden.

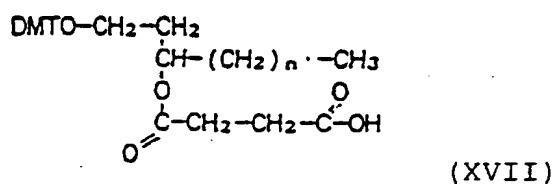
Außerdem bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Funktionalisierung eines festen CPG-Trägers (Controlled Porous Glass) durch die Verbindung der Formel X. Der derart funktionalisierte feste Träger ermöglicht die Herstellung von Nukleinsäuresonden des Typs I, in denen $z \neq 0$ ist, d.h. in denen ein Marker in 3' der Sonde eingeführt wird. In der Tat arbeiten alle bekannten manuellen oder automatischen Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger, mit einer Verlängerung der Kette in der Form von 3' nach 5'. Im Falle der Nukleinsäuresonden des Typs I, in denen $z \neq 0$ ist, ist es daher notwendig, die Synthese auf einem festen, durch eine Verbindung der Formel X oder XV funktionalisierten Träger zu beginnen. Um das Derivat X im Hinblick auf Verbindung XV leichter zu erhalten, haben wir indessen entschieden, den Träger mit X zu funktionalisieren.

Das beanspruchte Verfahren zur Funktionalisierung des festen Trägers - der Träger ist zu Beginn bereits mit primä-

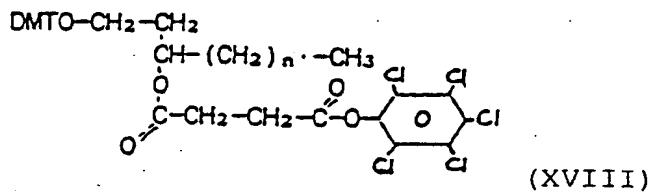
07-1088

ren Aminofunktionen versehen - umfaßt die nachfolgenden Schritte:

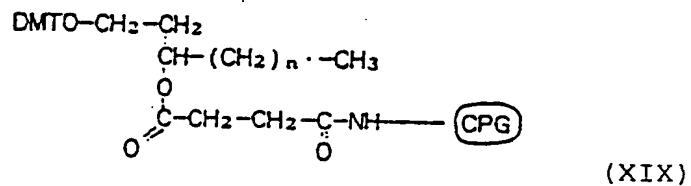
- Acylierung des sekundären Alkohols von X mit Succinanhydrid, um zur Verbindung der Formel XVII zu führen:



- Aktivierung der Carbonsäurefunktion der Verbindung XVII mit Pentachlorphenol in Gegenwart von Carbodiimid, die den Ester XVIII produziert:



- Fixierung des Derivats XVIII auf einem festen aminierten Träger. In dieser Art und Weise wird der funktionalisierte feste Träger XIX erhalten:



II. In 5' (OH) chemisch modifizierte Nukleinsäuresonden mit
einem molekularen Aufbau in Form eines "Kandelabers"

In derartigen Sonden besteht der Nukleotidteil aus einer bestimmten und zu einem komplementären Zielfragment homologen Nukleinsäuresequenz, die die Stabilisierungsenergie liefert und die Hybridisierung mit dem nachzuweisenden ADN- oder ARN-Molekül sicherstellt. Sie ist aus einer Kette von Phosphateinheiten aufgebaut, die von Riboseeinheiten unterbrochen werden.

Der Teil, der die Reaktivität liefert, die den direkten oder indirekten Nachweis des Hybrids ermöglicht, wird am 5' (OH)-Ende der zuvor beschriebenen Nukleinsäuresequenz eingeführt. Sie ist aus einer verzweigten Kette von Phosphateinheiten aufgebaut, die von Alkyleinheiten unterbrochen werden:

die verzweigungsinneren Alkyleinheiten, d.h. Vereinigungen der verschiedenen Phosphatgruppen, zeigen keine besondere chemische Funktionalität.

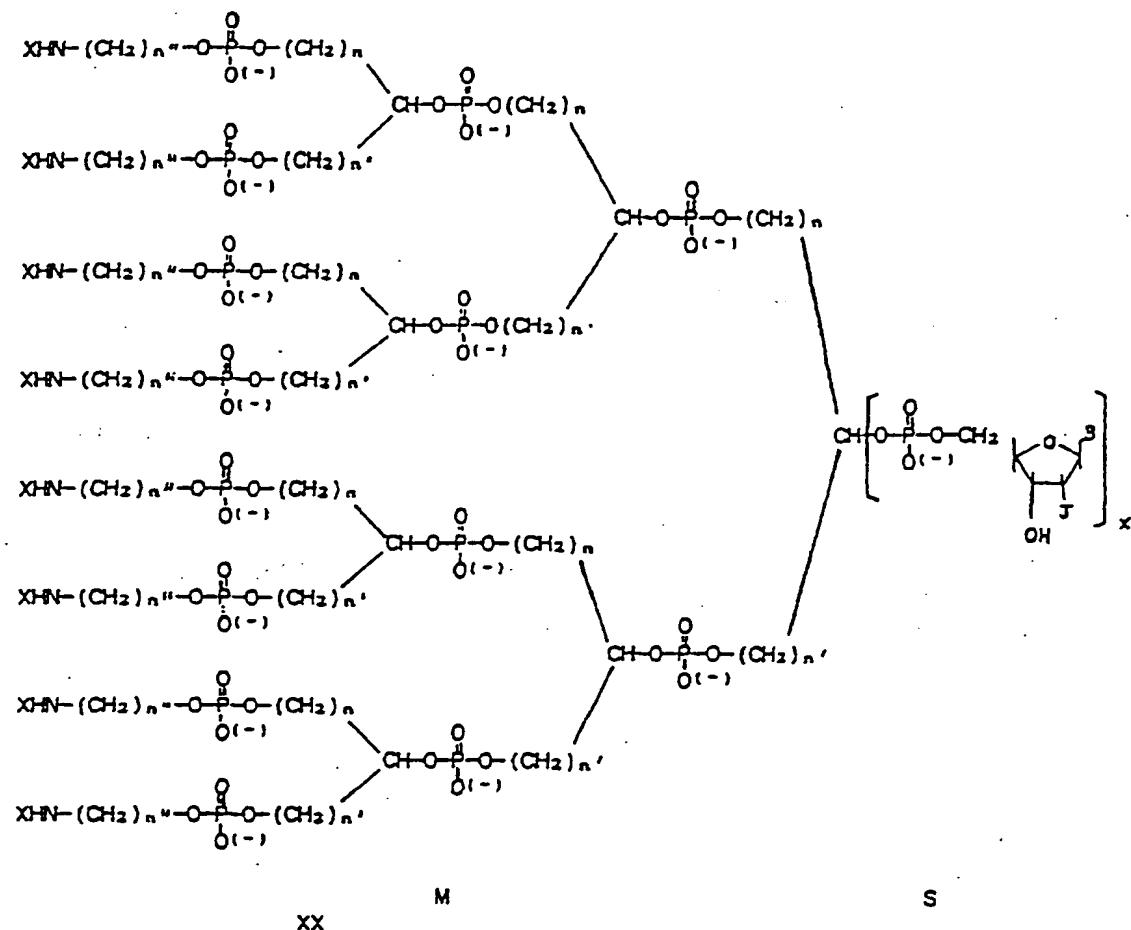
die verzweigungsäußereren Alkyleinheiten, d.h. die am Ende der verschiedenen Verzweigungszweige, besitzen am Ende einer Kette eine primäre Aminfunktion.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher eine Nukleinsäuresonde XX, die eine ADN- oder ARN-Nukleinsäuresequenz S umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz S an ihrem 5'-Ende mit einem Marker M verbunden ist.

Die chemische Modifikation liegt daher in 5' (OH) der Aminosäuresequenz derart vor, daß man sie mit der Formel XX,

07.10.86

zum Beispiel in nachfolgender Art und Weise detailliert darstellen kann:



Man kann die Einheiten S, L und M in folgender Art und Weise beschreiben:

S: Nukleinsäuresequenz,

J = H oder OH,

x stellt die Zahl der Nukleotide von 1 bis 1000 dar,

B: Nuklein-, Purin- oder Pyrimidin-säurebase, je nach den Nukleotiden veränderbar.

07.10.96

Man erinnere sich, daß die Nukleinsäuren Nukleotidpolymere sind, im Falle der ARN Ribonukleotidpolymere, im Falle der ADN Desoxyribonukleotidpolymere. Die Monomeren, d.h. die Nukleotide, sind im Falle von ARN aus Phosphorsäure, einer Ose mit 5 Kohlenstoffatomen, der Ribose ($J=OH$) und einer der vier grundlegenden Basen: Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil, aufgebaut. Im Falle von ADN ist Desoxyribose die D-2-Desoxyribose ($J=H$) und die vier hauptsächlichen Basen sind Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Eines der wesentlichen Charakteristika der Polynukleotide ist die Internukleotid-3'-5'-Phosphodiesterbindung.

M: ist der Marker, wobei er im oben beschriebenen Beispiel mit acht Aminzweigen endet. Man bezeichnet ihn deshalb als vom Grad 8. Der Verzweigungsgrad kann jedoch Werte von 2 bis 128 annehmen (die höhere Ordnung ist immer das Doppelte der vorhergehenden).

n, n' und n" = 1 bis 20

X: ist der eigentliche Marker, der entweder direkt ist: alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluorescein, jedes Enzym, das in der Lage ist, in Gegenwart eines Substrats eine Färbung oder Licht zu erzeugen; oder indirekt: Biotin, Digoxigenin, jedes Hapten, das durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkennbar ist.

Der Marker ist ein nichtnukleotides, verzweigtes Polymer. Eines der wesentlichsten Charakteristika dieses Polymers ist, ganz wie für ADN und ARN, die Phosphodiesterbindung zwischen den Monomeren.

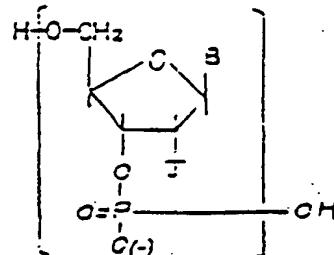
07.10.88

Das verzweigte Polymer M wird von zwei verschiedenen Monomertypen gebildet:

- Das für den Aufbau der verzweigten Struktur verantwortliche Monomer. Es wird durch Phosphorsäure und ein Triol, ein 1,n,ω-Alkantriol, gebildet.
- Das für die Einführung von primären Aminfunktionen am Verzweigungsende verantwortliche Monomer. Es wird durch die Phosphorsäure und einen Aminoalkohol, das 1-Amino-hexan-6-ol, gebildet.

Die Synthese der Verbindung XX kann daher durch klassische Internukleotidsynthese durchgeführt werden, da die verschiedenen Elemente von XX Polymere sind, von denen die Monomeren durch Phosphodiesterbindungen untereinander verbunden sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Sonden mit den Formeln XX, die die Synthese einer Nukleinsäuresequenz S umfassen:



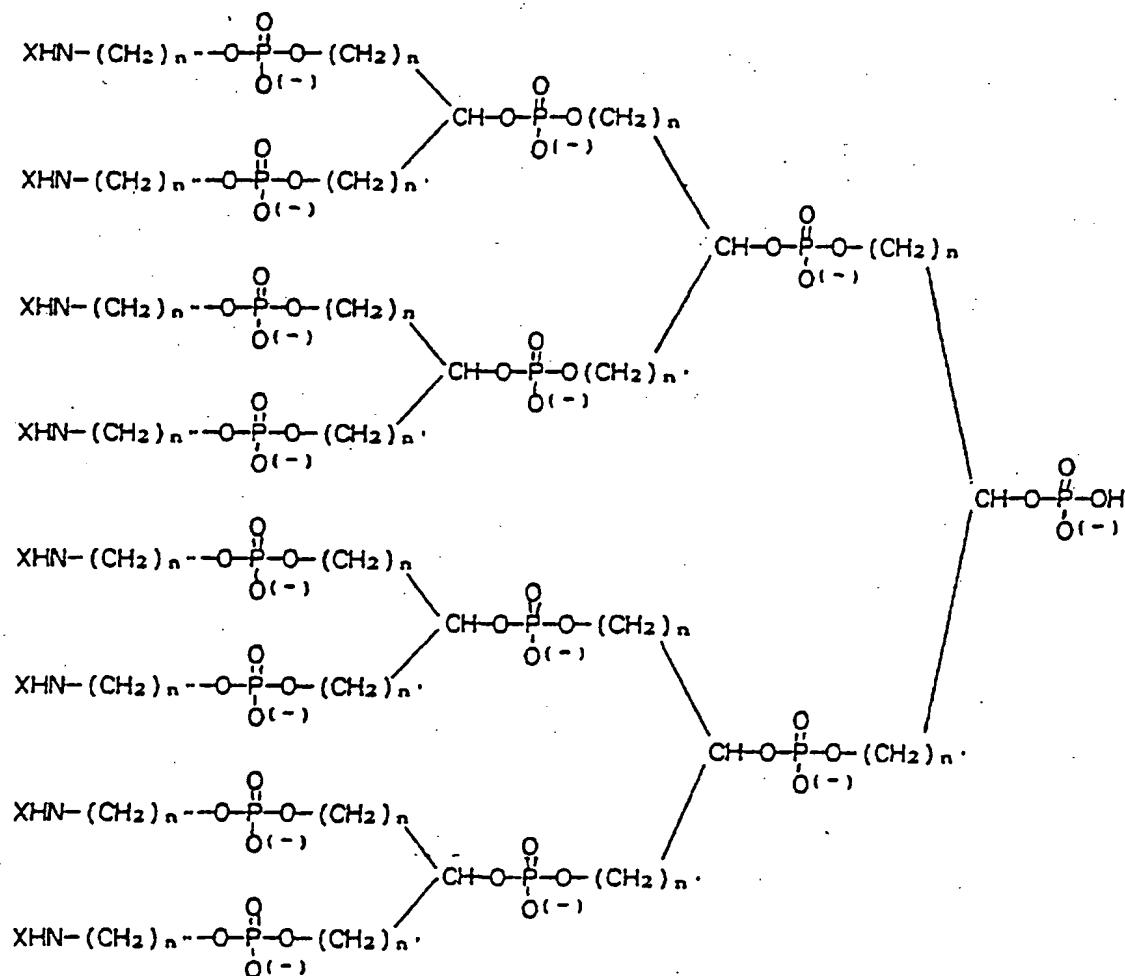
in der B und J die zuvor angegebenen Bedeutungen besitzen,

durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz, be-

07.10.88

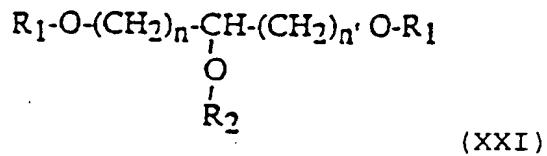
vorzugt mit demselben Syntheseverfahren, insbesondere auf einem festen Träger an ihrem 5' (OH)-Ende durch eine verzweigte molekulare Struktur M, von der die Endzweige jeweils eine primäre Aminfunktion tragen, einer Erweiterung unterzogen wird.

Der verzweigte molekulare Aufbau kann der nachfolgenden Formel entsprechen:



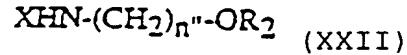
und kann insbesondere durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger, synthetisiert werden.

Insbesondere nach der Synthese der Oligonukleotidkette S, deren Phosphatfunktionen und deren Basen geschützt sind, kondensiert man am 5' (OH)-Ende dieser Kette eine Reihe von Verbindungen der Formel



in denen R_1 und R_2 die zuvor angegebenen Bedeutungen haben.

Außer der Verbindung XXI erfordert die Synthese von M zudem die Verwendung der Verbindung XXII, um Aminzweige am Verzweigungsende einzuführen.

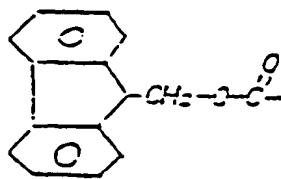


Diese Verbindung ist aus der Literatur bekannt.

In der Formel XXII stellt X - entweder einen Marker dar:

- alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluorescein, Biotin, Digoxigenin, jedes Hapten, das durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkennbar ist,
- oder eine Übergangsschutzgruppe für eine primäre Aminfunktion, die nach der Gesamtsynthese der Nukleinsäuresonde XX entfernt wird. Beispielsweise kann in diesem Syntheseansatz X ein Trifluoracetyl VII oder ein Fluorenylmethoxycarbonyl XXIII darstellen,

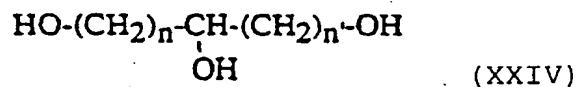
07.10.86



(XXIII)

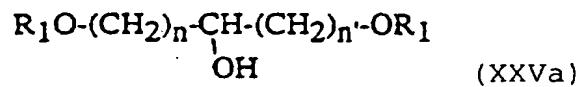
und R_2 hat die zuvor angegebene Bedeutung.

Erfindungsgemäß wird die Verbindung der Formel XXI erhalten, ausgehend von einem Alkantriol der Formel



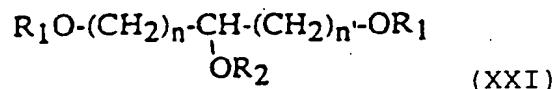
erhalten durch die nachfolgenden Schritte

a) Schutz der primären Alkoholfunktion durch eine Schutzgruppe R_1 , um eine Verbindung der Formel



zu erhalten,

b) Umwandlung der sekundären Alkoholfunktion in eine Gruppierung OR_2 , um eine Verbindung der Formel



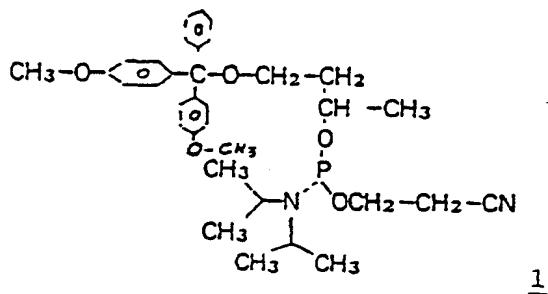
zu erhalten, in der R_2 die oben angegebene Bedeutung hat.

07-18-98

Insbesondere wird in Schritt a) der Schutz durch 4,4'-Dimethoxytritylchlorid durchgeführt und in Schritt b) findet eine Phosphorylierung der sekundären Alkoholfunktion durch Diisopropylaminocyanethoxychlorophosphin (XI) statt. Die Erfindung bezieht sich ebenfalls auf die Verbindungen der Formel XXI, beispielsweise als Synthesezwischenprodukte der Sonden der Formel XX, genauso wie auf ein Verfahren für die Herstellung der Zwischenprodukte der Formel XXI, so wie es oben beschrieben wird. Andere Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden anhand der folgenden Beispiele offensichtlich.

BEISPIEL I: Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-[N, N'-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphino]-1,3-butandiol

Das Derivat 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-[N, N'-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphino]-1,3-butandiol entspricht der Formel:



Der nachfolgende Ansatz betrifft die Herstellung eines nichtnukleotiden Synthons, das inzwischen die chemischen Gruppen trägt, die dessen Einführung in eine Oligonukleotidkette oder ein nichtnukleotides Polymer, dessen Monomere durch eine Phosphodiesterbindung verbunden sind, unter üb-

07.10.68

lichen automatischen ARN- oder ADN-Synthesebedingungen zu ermöglichen. Dieses Synthon hat den Vorteil, dem Verwender ein Instrument zu liefern, das die Einführung von "chemischen Zweigen" in 3' (OH) und (oder) in 5' (OH) einer Nukleinsäuresequenz ermöglicht, ohne die automatische oder manuelle Syntheseroutine zu verlassen. Die Aufgabe des chemischen Zweigs in diesem Verband ist es, Zwischenräume zwischen den verschiedenen Markern einerseits und zwischen den Markern und der Aminosäuresequenz andererseits einzubauen, für eine bessere Wirksamkeit der jeweils beiden Teile bei der Hybridisierung und dem Nachweis.

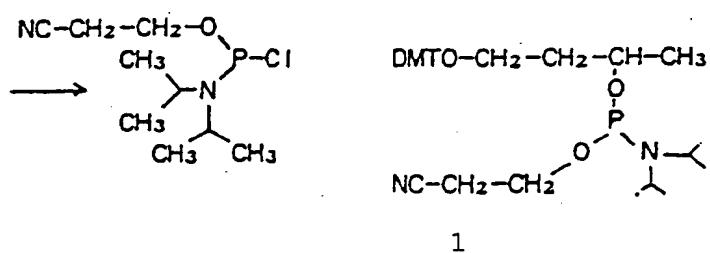
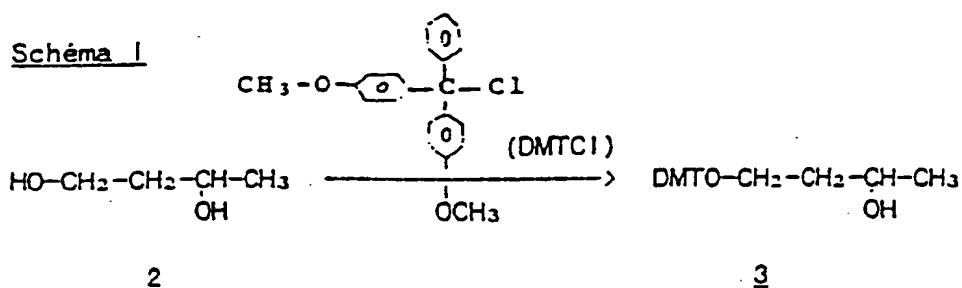
Die Gruppen 4, 4'-Dimethoxytrityl und 2-Cyanoethoxydiisopropylaminophosphoramidit sind für eine Synthese der Phosphoramidite, insbesondere auf einem festen Träger, geeignet.

Der im Schema I unten gezeigte Reaktionsweg, um die Verbindung 1 zu erhalten, umfaßt die nachfolgenden Schritte:

1. Selektiver Schutz des primären Alkohols von 1,3-Butandiol 2 durch die Gruppe 4,4'-Dimethoxytrityl (DMT), die bei saurem pH instabil ist.
2. Phosphorylierung des sekundären Alkohols 3. Das Beispiel für das im Schema gezeigte Phosphoramidit ist nicht beschränkend; man kann auch die Synthese eines Phophat-esters oder -diesters oder eines Phosphonats in Betracht ziehen.

07.10.98

Schéma 1



Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol 3

Man gibt 2,25 g (25 mMol) 1,3-Butandiol 2 unter Stickstoffatmosphäre in einen 100 cm³-2-Halskolben. Man gibt 40 cm³ wasserfreies Pyridin hinzu und gibt dann 11 g (32,5 mMol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in kleinen Mengen in die Lösung. Man röhrt mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur unter Argon für 1,5 Stunden. Man gibt dann 10 cm³ Methanol zur Reaktionsmischung zu. Diese Maßnahme hat den Zweck, den Überschuß an 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu neutralisieren. Dann hydrolysiert man die Reaktionsmischung (100 cm³ NaHCO₃ 5%) und extrahiert zweimal mit Dichlormethan (CH₂Cl₂ - 2mal 75 cm³). Die erhaltene organische Phase wird dreimal mit einer 5%igen Natriumbicarbonatlösung (NaHCO₃ 5%) gewaschen. Die organische Phase wird danach über Magnesiumsulfat (MgSO₄) getrocknet, filtriert und dann eingedampft (Rotationsverdampfer, P = 20 mm Hg).

07.10.68

Der Rückstand wird über eine Silikasäule Merck 9385 gereinigt - Elutionsmittel CH_2Cl_2 . Das Silika wird zuvor in Suspension in einer Lösung aus CH_2Cl_2 , die 1% Diisopropylethylamin (DIEA) enthält, neutralisiert. Nach der Reinigung gewinnt man 6,79 g der Verbindung 3 (17,32 mMol), Ausbeute 69%.

Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) auf Merck 5735-Platten (Silikagel 60F₂₅₄) Elutionsmittel CH_2Cl_2 : R_f = 0,3.

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-[N,N'-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphino]-1,3-butandiol 1

Man gibt 6,7 g der Verbindung 3 (17,3 mMol). Man setzt unter Stickstoffatmosphäre in einen 100 cm³-2-Halskolben und gibt dann 52 cm³ wasserfreies Tetrahydrofuran und 9 cm³ (51,9 mMol) Diisopropylethylamin zu. Anschließend gibt man zur Reaktionsmischung mit einer Spritze tropfenweise 5,52 g (23,35 mMol, 5 cm³) 2-Cyanoethoxydiisopropylaminochlorphosphin zu.

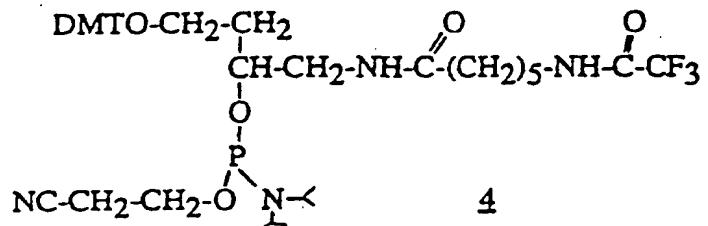
Nach zehn Reaktionsminuten erscheint inmitten der Reaktionsmischung ein beträchtlicher Niederschlag (Chlorhydrat von Diisopropylethylamin). Man filtriert diesen Niederschlag und gibt 100 cm³ Ethylacetat zum Filtrat, wäscht die derart erhaltene organische Phase dreimal mit einer 5%igen NaHCO_3 -Lösung. Die organische Phase wird dann über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft (Rotationsverdampfer, $P = 20 \text{ mm Hg}$). Der Rückstand wird über eine Silikasäule Merck 9385 gereinigt - und mit Ethylacetat 4 - Hexan 6 eluiert. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei im Elutionsmittel 1% DIEA enthalten ist. Nach der Reinigung gewinnt man 9,24 g der Verbindung 1. Ausbeute 90%.

07.10.96

Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) auf Merck 5735-Platten (Silikagel 60F₂₅₄), Elutionsmittel Ethylacetat 5 - Hexan 5. R_f : 0,8 (das Ausgangsprodukt dieser Reaktion 3a unter diesen Bedingungen hat einen R_f von 0,5).

BEISPIEL II: Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-(N,N'-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphino)-4-amido(6-trifluoracetylido)caproat-4-amino-1,3-butandiol 4

Das Derivat 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-(N,N'-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphino)-4-amido(6-trifluoracetylido)caproat-4-amino-1,3-butandiol 4 entspricht der Formel:



Der nachfolgende Ansatz betrifft die Herstellung eines nichtnukleotiden Synthons, das inzwischen die chemischen Gruppen trägt, die dessen Einführung in eine Oligonukleotidkette oder ein nichtnukleotides Polymer, dessen Monomere durch eine Phosphodiesterbindung verbunden sind, unter üblichen automatischen ARN- oder ADN-Synthesebedingungen ermöglichen.

Dieses System hat den Vorteil, dem Verwender ein Instrument zu liefern, das die Einführung von einem oder mehreren nichtisotopischen Markern in 3' (OH) und (oder) in 5' (OH) einer Nukleinsäuresequenz ermöglicht, ohne die automatische oder manuelle Syntheseroutine zu verlassen. Die Marker wer-

den durch die "chemischen Zweige" einerseits von der Oligonukleotidkette und andererseits voneinander getrennt. Die direkte Aufgabe des Markers, wie in diesem Beispiel beschrieben, ist in 5' (OH) und (oder) in 3' (OH) einer Oligonukleotidkette "primäre Amin"-Zweige einzuführen, die voneinander durch die "chemischen Zweige" getrennt sind. Die Aminzweige sind in der Lage, durch ihre Nukleophilie eine weitere direkte oder indirekte Nachweiseinheit zu fixieren (Enzym, Fluorescein, Biotin, Digoxigenin, ...).

Die Gruppen 4,4'-Dimethoxytrityl und N,N'-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphoramidit sind für eine Synthese der Phosphoramidite geeignet.

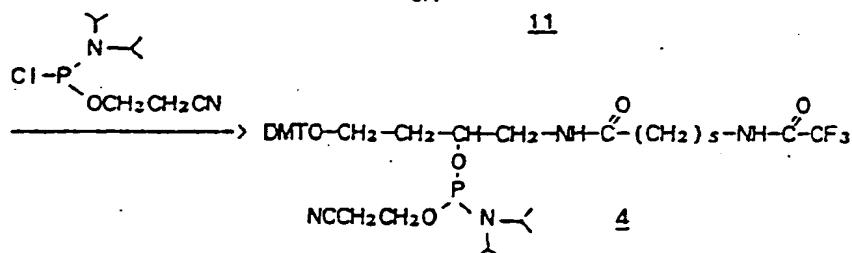
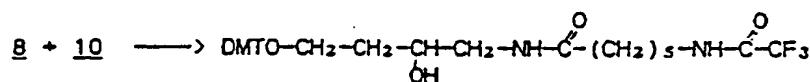
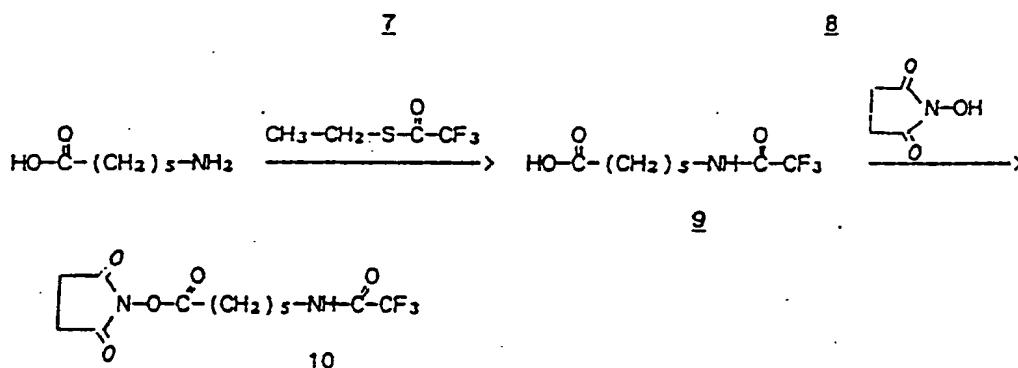
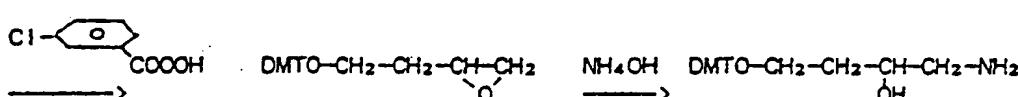
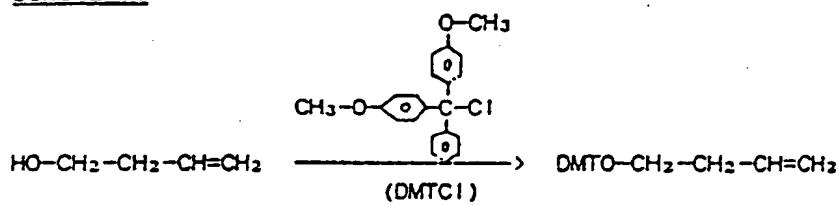
Der chemische Reaktionsweg, um die im nachfolgenden Schema II gezeigte Verbindung 4 zu erhalten, umfaßt die nachfolgenden Schritte:

1. Schutz des Alkohols von 3-Buten-1-ol 5 durch das 4,4'-Dimethoxytrityl (DMT), das bei saurem pH instabil ist.
2. Epoxidierung des Endolefins 6 mit m-Chlorperbenzoësäure.
3. Öffnung des Epoxids 7 mit Ammoniak.
4. Schutz des primären Amins von 6-Aminocapronsäure durch die Trifluoracetylgruppe.
5. Aktivierung der Carboxylsäure von Derivat 9 im N-Hydroxysuccinimidester 10.
6. Kondensation zwischen der Verbindung 8 und der Verbindung 10.

07.10.96:

7. Phosphorylierung des sekundären Alkohols 11. Das Beispiel des im Schema gezeigten Phosphoramidits ist nicht hierauf beschränkt. Man kann auch die Synthese eines Phosphatriesters oder -diesters oder eines Phosphonats in Betracht ziehen.

Schème 11



Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-buten-1-ol 6

In einen 250 ml-2-Halskolben gibt man 3,6 g (50 mMol) 3-Buten-1-ol unter Stickstoff in eine Lösung aus 80 cm³ wasserfreiem Pyridin. Man führt in kleinen Mengen 22 g (65 mMol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid ein (die Reaktion ist leicht exotherm).

Man beläßt bei Raumtemperatur und röhrt mit einem Magnetrührer für 4 Stunden. Dann gibt man 10 cm³ Methanol zur Reaktionsmischung, um den Überschuß an 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu neutralisieren. Man hydrolysiert anschließend die Reaktionsmischung mit 100 cm³ 5%igem NaHCO₃. Man extrahiert die Mischung zweimal mit 150 cm³ Dichlormethan. Die erhaltene organische Phase wird dreimal mit 5%igem NaHCO₃ gewaschen, dreimal mit Wasser und einmal mit einer mit NaCl gesättigten wässerigen Lösung. Die erhaltene organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingedampft (Rotationsverdampfer, P: 20 mm Hg).

Der erhaltene Rückstand wird anschließend mit Toluol nochmals eingedampft, um das restliche Pyridin azeotrop zu entfernen, und dann mit Dichlormethan nochmals eingedampft, um das restliche Toluol azeotrop zu entfernen. Der Rückstand wird dann über eine Silikasäule von Merck 9385 gereinigt, Elutionsmittel: Hexan 1-Dichlormethan 9. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel 1% DIEA enthält. Die Verbindung 6 wird mit 90%iger Ausbeute erhalten.

Dünnenschichtchromatographie (C.C.M.) mit Merck 5735-Platten (Silikagel 60F₂₅₄), Elutionsmittel Dichlormethan, Rf: 0,85.

07.10.98

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3,4-butenoxid 7

Kommerziell erhältliche m-Chlorbenzoësäure enthält 50% Wasser. Um dieses Wasser zu entfernen, löst man sie in Dichlormethan und entfernt das Wasser durch Dekantieren. In einen 100 cm³-Erlenmeyerkolben gibt man 8,5 g 50%ige m-Chlorperbenzoësäure (24,6 mMol) und löst sie mit 64 cm³ Dichlormethan. Man dekantiert die oben schwimmende wässrige Phase. In einen 250 cm³-Kolben gibt man 6,35 g der Verbindung 6 (17 mMol) unter Stickstoffatmosphäre. Diese löst man in 40 cm³ Dichlormethan. Dann gibt man langsam die (wie oben beschrieben) vorbereitete Persäurelösung zu. Man röhrt die Reaktionsmischung mit dem Magnetrührer über 8 Stunden. Dann filtriert man den Niederschlag, der sich gebildet hat (m-Chlorbenzoësäure). Zu dem Filtrat gibt man 150 cm³ Dichlormethan und hydrolysiert es mit 75 cm³ 5%igem NaHCO₃. Die organische Phase wird viermal mit 75 cm³ 5%igem NaHCO₃ gewaschen, dann über MgSO₄ getrocknet, filtriert und abgedampft (Rotationsverdampfer, P = 20 mm Hg). Der Rückstand wird auf einer Silikasäule von Merck 9385 gereinigt - Elutionsmittel Hexan 2 - Dichlormethan 8. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung erhält man 5,32 g des Epoxids 7, Ausbeute 80%.

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-amino-1,3-butandiol 8

In einen 25 cm³-Pyrexkolben, versehen mit einem Schraubstopfen, der in der Lage ist, beträchtliche Drücke auszuhalten, gibt man 3 g (7,6 mMol) des Epoxids 7, 10 cm³ Acetonitril und 25 cm³ 32%igen Ammoniak. Man erhitzt 8 Stunden auf 60 °C und dampft dann das Wasser und das Acetonitril ab. Der erhaltene Rückstand wird über eine Silikasäule von

07.10.68

Merck 9385 gereinigt, Elutionsmittel CH_2Cl_2 - CH_3OH , wobei die Methanolmenge allmählich von 2 auf 10% gebracht wird. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Ausgangselutionsmittel 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung erhält man das Derivat 8 mit einer Ausbeute von 75%. Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) auf Merck 5735-Platten, Silikagel 60F₂₅₄ - Elutionsmittel 20% CH_3OH - 80% CH_2Cl_2 , Rf 0,2.

Verfahren zur Herstellung von 6-Trifluoracetamidocapronsäure 9

In einen 50 cm³-Rotationsverdampferkolben gibt man 2,62 g (2×10^{-2} Mol) 6-Aminocapronsäure. Man suspendiert sie in 4 cm³ wasserfreiem Dimethylformamid und gibt dann zu der Suspension 3 cm³ ($2,35 \times 10^{-2}$ Mol) S-Ethyltrifluorthioacetat zu. Man setzt unter Stickstoffatmosphäre und röhrt 4 Stunden, wobei die Lösung noch durchsichtig ist. Man dampft das Dimethylformamid unter reduziertem Druck ab ($P = 20$ mm Hg). Der Rückstand wird aus Dichlormethan auskristallisiert. Die Verbindung 9 wird mit einer Ausbeute von 84% erhalten. Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) - Merck 5735-Platten, Silikagel 60F₂₅₄ - Elutionsmittel 20% CH_3OH - 80% CH_2Cl_2 , Rf 0,5.

Verfahren zur Herstellung von 6-Trifluoracetamidocaproat von N-Hydroxysuccinimid 10

In einen 100 ml-Kolben gibt man 2,27 g (10^{-2} Mol) der Verbindung 9, 2,04 g (10^{-2} Mol) Dicyclohexylcarbodiimid und 1,15 g (10^{-2} Mol) N-Hydroxysuccinimid. Man gibt 40 cm³ CH_2Cl_2 zu und röhrt 5 Stunden unter Stickstoffatmosphäre. Ein weißer Niederschlag bildet sich und wird filtriert. Das Filtrat wird eingedampft. Der erhaltene Rückstand zeigt in

07.16.96

der Dünnschichtchromatographie nur einen einzigen Fleck, er wird nicht gereinigt. Die Ausbeute ist quantitativ.

Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) - Merck 5735-Platten, Silikagel 60F₂₅₄ - Elutionsmittel 5% CH₃OH - 95% CH₂Cl₂, Rf 0,7.

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-amido-(6-trifluoracetylarnido)-caproat-4-amino-1,3-butandiol 11

In einen 50 cm³-2-Halskolben gibt man unter Stickstoffatmosphäre 2,44 g (6 mMol) der Verbindung 8 und 3,44 g (9,45 mMol) der Verbindung 10. Man löst in 25 cm³ wasserfreiem Dimethylformamid und röhrt 16 Stunden. Man dampft dann das Dimethylformamid im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck ab (P = 20 mm Hg). Der erhaltene Rückstand wird über eine Silikasäule von Merck 9385 gereinigt, Elutionsmittel 5 Hexan - 95 CH₂Cl₂, dann CH₃OH 2 → 10 - CH₂Cl₂ 98 → 90. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel zu Anfang 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung wird die Verbindung 11 mit 84%iger Ausbeute erhalten. Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) - Merck 5735-Platten, Silikagel 60F₂₅₄ - Elutionsmittel 10% CH₃OH - 90% CH₂Cl₂, Rf 0,8.

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-(N,N-diisopropylarnino-2-cyanoethoxyphosphino)-4-amido-(6-trifluoracetylarnido)-caproat-4-amino-1,3-butandiol 4

In einen 50 cm³-2-Halskolben gibt man unter Stickstoffatmosphäre 2 g (3 mMol) von Derivat 11. Man fügt 17 ml wasserfreies Tetrahydrofuran, 1,6 cm³ Diisopropylamin und 0,8 cm³ (4,1 mMol) N,N'-Diisopropylarnino-2-cyanoethoxychlorphosphin hinzu. Man röhrt 1 Stunde bei Raumtemperatur und fügt dann

zur Lösung 25 cm³ Ethylacetat und 20 cm³ 5%iges NaHCO₃ zu. Die erhaltene organische Phase wird dann dreimal mit 5%igem NaHCO₃ gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und bis zur Trockene eingedampft (P = 20 mm Hg). Der Rückstand wird über eine Silikasäule von Merck 9385 gereinigt, Elutionsmittel Hexan 15 - Ethylacetat 85. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung erhält man das Derivat 4 mit 62%iger Ausbeute. Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) - Elutionsmittel Hexan 10 -Ethylacetat 90, Rf 0,75.

BEISPIEL III: Studie der Reaktivität der Derivate 1 und 4

Die nichtnukleotiden Phosphoramidite 1 und 4 können jeweils eingesetzt werden, um in 5' (OH) und (oder) in 3' (OH) ein Oligonukleotid einzuführen:

- chemische Zweige (Derivat 1)
- "primäre Amin"-Zweige (Derivat 4)

Die "primären Amin"-Zweige sind voneinander und von der Oligonukleotidkette durch die chemischen Zweige getrennt.

Mit dem Zweck, derartige biopolymere Strukturen zu verwirklichen, wurde die Reaktivität der Verbindungen 1 und 4 unter den üblichen automatischen ADN- oder ARN-Synthesebedingungen überprüft.

Hierzu werden die Derivate 1 und 4 in einer automatischen Synthesevorrichtung für Oligonukleotide kondensiert, wobei sie in 5' (OH) von einem Thymidin-Thymidin (T-T)-Dimeren auf einen festen Träger kondensiert wurden (CPG-Träger - Controlled Porous Glass, typisch bei automatischen Synthesen).

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4 stammenden Aminzweig mit N, und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die bei 5' (OH) modifizierten Dimeren T-T, die synthetisiert wurden, die folgenden:

NTT 12

STT 13

NSTT 14

SNSTT 15

Die Derivate 1 und 4 werden erfolgreich in 5' (OH) eines Oligonukleotids als Verlängerung gebunden (vgl. NTT, STT). Die Verbindung 4 wird erfolgreich im Anschluß an den chemischen Zweig gebunden (vgl. NSTT) und die Verbindung 1 wird genauso im Anschluß an den Aminzweig gebunden (vgl. SNSTT). Alle Bedingungen (Kupplungszeit, Konzentration der Reagenzien und Lösungsmittel), die herkömmlicherweise im Laufe eines Oligonukleotidverlängerungszyklusses verwendet werden, erweisen sich hinsichtlich der Kondensation von 1 als geeignet.

Dennoch mußten für die Kondensation von 4 die üblicherweise verwendeten Bedingungen (Konzentration von Phosphoramidit 0,1 M und Kondensationszeit 25 Sekunden) optimiert werden. In der Tat kondensiert das Derivat 4 mit einer fast quantitativen Ausbeute, wenn man eine Konzentration von 0,1 M Phosphoramidit einsetzt, und die Kondensationszeit 10 Minuten ist.

Man erhält in jedem der vier durchgeführten Kondensationsversuche ein beinahe reines Produkt, wie es auch die Analysergebnisse der Kapillarelektrophorese zeigen (Fig. 1). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Kondensationsreaktionen, der Oxidationsabbau und die Spaltung vom festen Träger nach

der Synthese wirksam ist und die trimeren (NTT, STT), tetrameren (NSTT) und pentameren (SNSTT) Formen nicht abbauen. Zudem ist es bei der Oligonukleotidsynthese möglich, die Lösung zur Entfernung der Dimethoxytritylschutzgruppe wiederzugewinnen, und die Intensität der orangenen Farbe des Kations zu messen, um die Ausbeute jeder Kondensation abzuschätzen. Diese Messungen wurden für die Kondensationen von S und N durchgeführt, wobei sie fast quantitative Ausbeuten ergeben.

Die Labilität der Schutzgruppe des Amins (Trifluoracetylgruppe) wurde ebenfalls untersucht. In der Tat zeigen sich die für die Spaltung einer Oligonukleotidkette auf einem festen Träger typischen Bedingungen (NH_4OH 32%, 1H, RT) zur Entfernung der Schutzgruppen der Phosphate und Amine der Basen der Oligonukleotidkette (NH_4OH 32%, 8H, 55°C) als ausreichend, um vom durch Kondensation eines Monomeren 4 eingefügten primären Amin in den Polymeren 12, 14 und 15 die Schutzgruppe zu entfernen.

Kupplung des Derivats 1 oder des Derivats 4 in fester Phase mit einem Dimeren Thymidin-Thymidin, fixiert auf einem unlöslichen festen Träger.

Das Derivat 1 oder das Derivat 4, gelöst in wasserfreiem Acetonitril bei einer Konzentration von 0,1 M wird durch 0,5 M Tetrazol im gleichen Lösungsmittel aktiviert und mit der Hydroxylgruppe in 5'-Position von einem Thymidin-Thymidin-Dimeren, fixiert auf einem üblicherweise unlöslichen festen Träger, der bei einer Oligonukleotidsynthese in einem Synthesator ABI 394 eingesetzt wird, kondensiert. Hinsichtlich der Kondensation der Verbindung 1 sind alle Bedingungen mit denen bei einem Oligonukleotidverlängerungszyklus eingesetzten identisch (N.D. Sinha, J. Biernat,

07.10.88

J. MacManus und H. Köster, Nucleic Acids Research (1984),
12(11), 4539).

Hinsichtlich der Kondensation von Verbindung 4 sind die Bedingungen mit denen in einem Oligonukleotidverlängerungszyklus eingesetzten identisch, mit Ausnahme der Kupplungszeit, die auf 10 Minuten ausgedehnt wird; während sie bei den typischen Kupplungsbedingungen 25 Sekunden beträgt.

Die Spaltung vom festen Träger wird unter üblichen Bedingungen durchgeführt (NH₄OH 32%) und das Endprodukt wird mit einer Ausbeute, vergleichbar den gewöhnlich bei einer Oligonukleotidsynthese erreichten, erhalten.

Die tri-, tetra- und pentameren Syntheseprodukte 12, 13, 14 und 15 werden mittels Kapillarelektrophorese analysiert (vgl. Fig 1); ABI 270A, Kapillarsäule MICRO-GEL₁₀₀, Innen-durchmesser 50 µm, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, Puffer 75 mM Tris-Phosphat, 10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL IV: Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die bei 5'(OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von Aminzweigen unterbrochen sind, welche für den Nachweis der ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren verwendbar sind.

Die Synthese und der Einsatz gemischter Moleküle, die aus einem Oligodesoxynukleotidteil und einem anderen, charakteristische chemische Eigenschaften besitzenden Teil zusammengesetzt sind, ermöglichen leicht und schnell den Nachweis der Zieldesoxyribonukleinsäuren durch nichtradioaktive Verfahren. Der Oligodesoxyribonukleotidteil der bestimmten und zu einem ADN-Zielfragment homologen Sequenz liefert die Stabilisierungsenergie und stellt die Hybridisierung mit

dem nachzuweisenden ADN-Molekül sicher. Der Teil, der die Reaktivität liefert, die den direkten oder indirekten Nachweis des Hybrids ermöglicht, kann am 5' (OH)- und (oder) 3' (OH)-Ende der Nukleinsäuresequenz eingeführt werden. In diesem präzisen Beispiel wird der für den Nachweis verantwortliche Teil im wesentlichen bei 5' (OH) der Nukleinsäuresequenz eingeführt.

Der für den Nachweis verantwortliche Teil wird bei 5' (OH) der noch auf dem festen Träger fixierten Oligonukleotidkette eingeführt, und die Basen und Phosphate werden geschützt, indem man eine Reihe von Kondensationen der Derivate 1 und 4 unter Verwendung der gleichen Reaktionszyklen des automatischen ADN-Synthesators, wie die für die Synthese der Nukleinsäuresequenz verwendeten, durchführt. Jedoch wird hinsichtlich des Derivats 4 die Kondensationszeit auf 10 Minuten anstelle der 25 Sekunden des typischen Zyklusses ausgedehnt.

Nach der Spaltung der 5'-modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger und der Entfernung der Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten, wird der Teil, der die Reaktivität liefert, die für den Nachweis verantwortlich ist, durch eine kovalente chemische Bindung eingeführt. Von den verschiedenen Molekülen, die für den Nachweis erforderlichen Eigenschaften besitzen, setzt man bevorzugt Biotin, Digoxigenin, Fluorescein, Peroxidase und alkalische Phosphatase ein. Diese Moleküle, die entsprechend aktiviert sind, werden an der Oligonukleotidkette auf der Ebene der primären Amine, die hierzu aufgrund ihrer Nukleophilie eingeführt werden, fixiert.

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4 stammenden Aminzweig mit N und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die bei

5' (OH) modifizierten Oligomeren, die synthetisiert wurden, die folgenden:

NSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	16
NSSNSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	17
NSSNSSNSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	18
NSSNSSNSNSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	19

Nach der Abspaltung der derart modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger und der Entfernung der Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten, werden die Sonden 16, 17, 18 und 19 biotinyliert, um zu den biotinylierten Sonden, 20, 21, 22 und 23 zu führen, die mit Kapillarelektrophorese (Fig. 2a, 2b) analysiert werden.

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4, gefolgt von einer Biotinylierung stammenden Aminzweig mit B und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die bei 5' (OH) mono- oder polybiotinylierten Sonden, die erhalten wurden, die folgenden:

BSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	20
BSSBSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	21
BSSBSSBSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	22
BSSBSSBSSBSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA	23

Fig. 2a, 2b.

Verfahren zur Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die bei 5' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von Aminzweigen 16, 17, 18 und 19 unterbrochen sind

Eine ADN-Sonde wird mit einer zu einer Zielsequenz komplementären Oligodesoxynukleotidsequenz synthetisiert. Man stellt in fester Phase in einem automatischen ADN-

Synthesator ABI 394 gleichzeitig vier identische Sonden (in vier Reaktoren) der Sequenz 5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA3' her. Der Synthesator ist programmiert, Fixationszyklen bei 5' der Einheiten 1 und 4 fortzusetzen, um jeweils zu den Biopolymeren 16, 17, 18 und 19 zu führen. Hierzu setzt man 6 mg mit 34 μ Mol/g, entsprechend 0,2 μ Mol Dimethoxytrityl-benzoyladenosin funktionalisierten CPG-Träger ein. Das Derivat 1 und das Derivat 4 werden mit einer Konzentration von 0,1 M in wasserfreiem Acetonitril gelöst und in den Synthesator an den vorgegebenen Stellen für nichttypische Phosphoramidite eingeführt. Nach der automatischen Synthese der Biopolymere 16, 17, 18 und 19 werden die derart modifizierten Oligonukleotidketten durch 4 fünfzehnminütige, aufeinanderfolgende Behandlungen mit 500 μ l 32%igem NH₄OH von den CPG-Trägern abgelöst. Die erhaltenen ammoniakalischen Lösungen werden 5 Stunden bei 55°C erwärmt. Die zweite Behandlung dient dazu, von den Basen und Phosphaten der Oligonukleotidketten die Schutzgruppen zu entfernen. Die ammoniakalischen Lösungen werden lyophilisiert, wobei die vier Rückstände einer molekularen Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid unterzogen werden.

Verfahren zur Biotinylierung der gemischten Oligodesoxyribonukleotidmoleküle, die bei 5' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, und von Aminzweigen unterbrochen sind, Herstellung der biotinylierten Sonden 20, 21, 22 und 23

In einem Eppendorfgefäß löst man 20 DO der aminierten Sonde 16, 17, 18 oder 19 in 120 μ l 0,01 M Phosphatpuffer mit pH 7,5. Man gibt eine Lösung von 20 mg Sulfosuccinimidyl-6-biotinamidocaproat in 240 μ l Dimethylformamid zu. Man inkubiert 16 Stunden bei Raumtemperatur. Jede Lösung wird einer molekularen Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50)

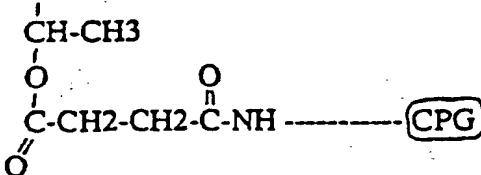
07.10.98

unterzogen und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid. Die biotinylierten Sonden 20, 21, 22 und 23 werden mittels Kapillarelektrophorese analysiert, Mikro-Gel₁₀₀, Innendurchmesser 50 µm, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, 75 mM Tris-Phosphatpuffer - 10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL V: Herstellung eines festen CPG-Trägers (Controlled Porous Glass), funktionalisiert mit dem 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol

Der mit dem 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol 3 funktionalisierte CPG-Träger besitzt die Formel 24.

DMTO-CH₂-CH₂



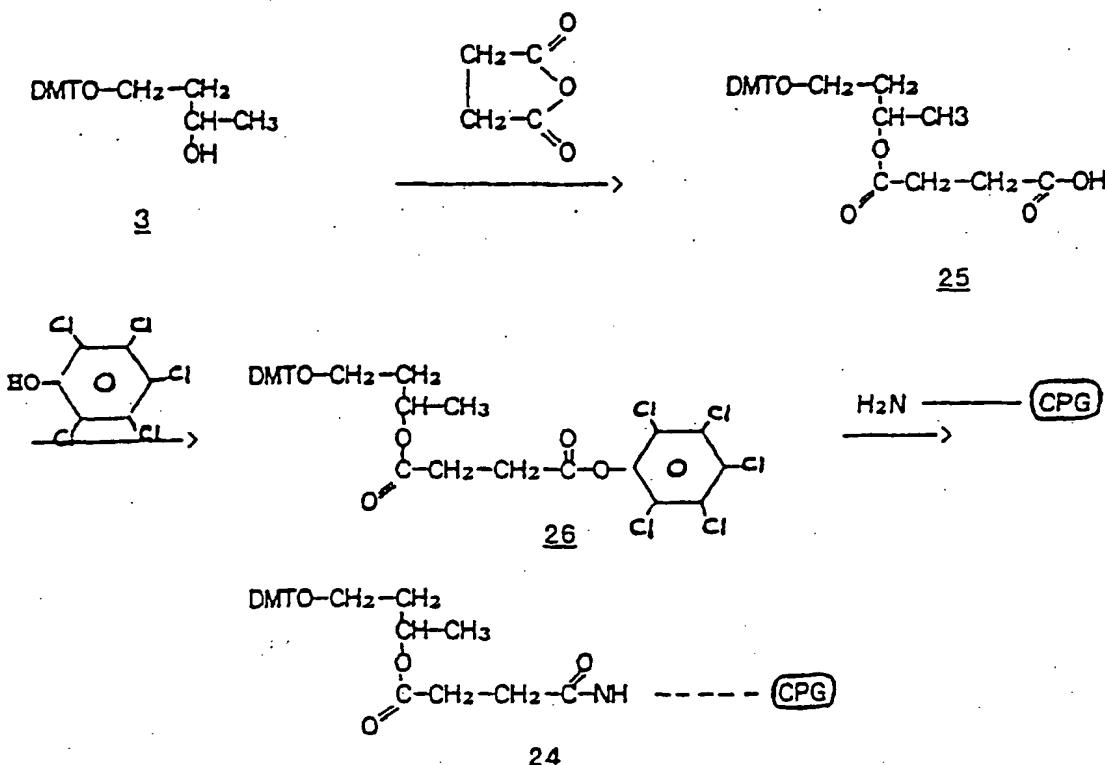
24

Der nachfolgende Ansatz bezieht sich auf die Herstellung eines entsprechend funktionalisierten festen Trägers, um Nukleinsäuresonden herzustellen, in denen ein oder mehrere Marker, unterbrochen von chemischen Zweigen, bei 3' (OH) der Sonde durch jedes manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren auf einem festen Träger eingeführt werden können.

Das angepaßte Verfahren zur Funktionalisierung des CPG-Trägers umfaßt die nachfolgenden Schritte (Schema III):

07.10.68

Schema III



Das 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol 3 wird am freien sekundären Alkohol mit Succinanhydrid acyliert, dann die erzeugte Säure 25 in Form des Pentachlorphenolesters 26 aktiviert. Auf dem CPG-Träger befinden sich an der Oberfläche "primäre Amin"-Funktionen, die das Derivat 26 durch Bildung einer Amidbindung, ausgehend vom aktivierten Ester, fixieren.

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-succinat-1,3-butandiol 25

Man gibt unter Argon 2,35 g (6 mMol) der Verbindung 3 in einen 50 cm³-2-Halskolben, fügt 22 cm³ wasserfreies Pyridin, 0,74 g (6,1 mMol) 4-Dimethylaminopyridin und 0,64 g (6,4 mMol) Succinanhydrid zu. Man röhrt die Reaktionsmi-

07.10.95

schung 3 Tage bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer. Man gibt dann zur Reaktionsmischung Toluol und entfernt anschließend das Pyridin mit dem Toluol azeotrop (Rotationsverdampfer, $P = 20$ mm Hg). Der erhaltene Rückstand wird in 75 cm^3 Dichlormethan gelöst. Die derart erhaltene organische Phase wird zweimal mit einer 4×10^{-2} M Zitronensäurelösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft (Rotationsverdampfer, $P = 20$ mm Hg). Der Rückstand wird über eine Silikasäule von Merck 9385 - Elutionsmittel: Gradient Hexan 15 - CH_2Cl_2 85 \rightarrow CH_2Cl_2 100 \rightarrow MeOH 3 - CH_2Cl_2 97 gereinigt. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel zu Beginn 1% DIEA enthält. Man erhält nach der Reinigung 1 g der Verbindung 25, Ausbeute: 34%.

Verfahren zur Herstellung von 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-(pentachlorphenoxy succinat)-1,3-butandiol 26

Man gibt 1 g der Verbindung 25 (2 mMol) in einen 25 cm^3 -2-Halskolben, setzt unter Stickstoffatmosphäre und gibt 0,58 g Pentachlorphenol (2,2 mMol) und 14 cm^3 einer 0,62 g Dicyclohexylcarbodiimid (3 mMol) in wasserfreiem Dimethylformamid enthaltenden Lösung zu. Man röhrt die Reaktionsmischung mit dem Magnetrührer 24 Stunden bei Raumtemperatur. Man filtriert den Dicyclohexylharnstoff-Niederschlag ab, dann wird der Niederschlag mit 50 cm^3 Benzol gewaschen. Man dampft das Benzol ab.

Der Rückstand wird über eine Silikasäule von Merck, 9385 gereinigt - Elutionsmittel Hexan 15 - Dichlormethan 85. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung erhält man 1,7 g der Verbindung 26, Ausbeute = $\pm 100\%$.

Herstellung eines festen CPG-Trägers (Controlled Porous Glass), der mit der Gruppierung 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol 24 funktionalisiert ist

Der eingesetzte feste Träger (PIERCE, Ref. 24875) besitzt eine Porosität von 500 Å. Er wird an der Oberfläche mit den "primären Amin"-Gruppen funktionalisiert. Man gibt 0,5 g des aminierten CPG-Trägers, 0,2 cm³ frisch destilliertes Triethylamin, 0,385 g Pentachlorphenolester 26 (0,26 mMol) und 1,3 cm³ wasserfreies Dimethylformamid in einen 10 cm³-Kolben. Man verschließt den Kolben und röhrt 24 Stunden bei 37°C. Zu diesem Zeitpunkt kontrolliert man an einem kleinen Teil des festen Trägers, ob er von 26 wirksam funktionalisiert wurde. Dieser Teil wird mehrfach mit Ethanol und dann mit Ether gewaschen, dann mit einer 0,1 M Lösung p-Toluolsulfonsäure in wasserfreiem Acetonitril behandelt. Dieser Arbeitsschritt hat das Ziel, die Schutzgruppe vom primären Alkohol zu entfernen und führt zum Auftreten der orangen Färbung des in diesem wasserfreien Milieu gebildeten Dimethoxytritylkations. Wenn also die orangene Färbung auftritt, kann damit die Behandlung des derart funktionalisierten Trägers verfolgt werden.

Man führt die Neutralisation der primären Aminfunktionen des Trägers, der nicht reagiert hat, fort. Hierfür gibt man 70 µl Acetanhydrid zur Reaktionsmischung und lässt 10 Minuten bei 37°C röhren. Man filtriert dann den festen Träger ab. Der Träger wird anschließend nacheinander mit 20 cm³ Dimethylformamid, 20 cm³ Ethylalkohol, 20 cm³ Dioxan und 20 cm³ Ethylether gewaschen. Er wird dann in einem Exsikkator unter Vakuum (P = 20 mm Hg) in Gegenwart von Phosphorpentoxid getrocknet. Man nimmt nun eine Bestimmung der auf dem Träger fixierten Anzahl Moleküle 26 vor durch quantitative spektroskopische (sichtbare) Bestimmung der Anzahl der im

07.10.93

sauren Millieu pro Gramm Träger freigesetzten 4,4'-Dimethoxytritylgruppen.

In eine 10 cm³-Meßküvette gibt man 8,1 mg des funktionalisierten CPG-Trägers und fügt 10 ml 0,1 M p-Toluolsulfinsäure in wasserfreiem Acetonitril zu. Die Lösung färbt sich orange, wobei die Ablesung 497 nm ergibt, $\epsilon = 7 \times 10^4$. Man mißt eine Absorption von 1,72.

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot 10^4} = \frac{1,72}{7 \cdot 10^4 \cdot 1} = 0,245 \text{ mol/l}$$

Die Funktionalisierung des Trägers ist demnach 30,3 $\mu\text{Mol/g}$.

BEISPIEL VI: Studie der Reaktivität eines mit den 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol-Einheiten funktionalisierten CPG-Trägers

Der CPG-Träger 24, der mit den 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,3-butandiol-Einheiten funktionalisiert ist, kann zur Einführung

- von chemischen Zweigen (Kondensation von Derivat 1)
- von "primären Amin"-Zweigen (Kondensation von Derivat 4) bei 3' (OH) eines Oligonukleotids eingesetzt werden.

Die "primären Amin"-Zweige sind voneinander und von der Oligonukleotidkette durch die chemischen Zweige getrennt.

Mit dem Ziel, einen derartigen biopolymeren Aufbau zu verwirklichen, wurde die Reaktivität des CPG-Trägers 24 unter den Bedingungen der automatischen Oligonukleotidsynthese getestet. Hierzu wurde der CPG-Träger 24, der in den Reaktor einer automatischen Oligonukleotidsynthesevorrichtung hineingegeben wurde, einer Reihe von Kondensationen mit je-

weils den Phosphoramiditen 1, 4 und dem Thymidin (T) unterzogen.

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4 stammenden Aminzweig mit N und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die Polymere, die synthetisiert wurden, die folgenden:

TTSS 27

TTNS 28

SSTT 29

NSTTSNS 30

Das Tetramer SSTT wurde allein zum Vergleich mit TTSS für die Kapillarelektrophorese hergestellt. Die Phosphoramidite 1 und 4 werden daher erfolgreich auf dem CPG-Träger 24 unter den typischen Bedingungen (Kupplungszeiten, Lösungsmittel, Reagenzien) einer Kondensation eines automatischen Oligonukleotidsynthesators fixiert. Dennoch muß bei der Kondensation von Verbindung 4 die Kupplungszeit anstatt von 25 Sekunden beim typischen Zyklus auf 10 Minuten ausgedehnt werden. Die eingesetzten typischen Bedingungen für die Spaltung der Oligonukleotide von ihrem festen Träger (32% NH₄OH - 4 x 500 µl - 15 Minuten) erweisen sich als geeignet, da die Verbindungen 27, 28 und 30 mit guten Ausbeuten erhalten werden.

Man erhält in jedem der durchgeführten Kondensationsversuche ein relativ reines Produkt, wie es auch die Analysenergebnisse bei der Kapillarelektrophorese zeigen (Fig. 3).

Außerdem ist es bei der Oligonukleotidsynthese möglich, die Lösung zur Entfernung der Dimethoxytritylschutzgruppe wiederzugewinnen und die Intensität der orangenen Färbung des Kations zu messen, um die Ausbeute jeder Kondensation zu

bestimmen. Diese Messungen wurden für jede Kondensation auf dem Träger 24 durchgeführt. Sie zeigen nahezu quantitative Ausbeuten.

Kondensation der Phosphoramidite 1 und 4 auf den CPG-Träger 24, Synthese der Polymere 27, 28 und 30

Man stellt gleichzeitig die drei Polymere 27, 28 und 30 in einem automatischen Oligonukleotidsynthesator ABI 394 her. Hierzu füllt man in drei Reaktoren 6,6 mg (0,2 µMol) des mit 30,3 µMol/g funktionalisierten CPG-Trägers 24. Das Derivat 1 und das Derivat 4 werden in wasserfreiem Acetonitril mit einer Konzentration von 0,1 M gelöst und in den Synthesator, an den für nichttypische Phosphoramidite vorgesehenen Stellen hineingegeben. Der Synthesator wird programmiert, um Kondensationszyklen von 1, 4 und T gemäß den Sequenzen von 27, 28 und 30 durchzuführen. Nach der automatischen Synthese von 27, 28 und 30 werden die Polymere durch 4 15minütige aufeinanderfolgende Behandlungen mit 500 µl 32%igem NH₄OH von den CPG-Trägern abgelöst. Die ammoniakalischen Lösungen werden lyophilisiert und die Rückstände mittels Kapillarelektrophorese (ABI 270 A) analysiert; Mikro-Gel₁₀₀-Säule, Innendurchmesser 50 µm, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, 75 mM Tris-Phosphatpuffer-10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL VII: Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die bei 3' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, unterbrochen von aminierten Zweigen, die für den Nachweis von ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren verwendbar sind.

Die gemischten Molekülzusammensetzungen mit einem Oligodesoxyribonukleotidteil und einem anderen Teil, der charakteristische chemische Eigenschaften besitzt, ermöglicht leicht und schnell den Nachweis von Ziel desoxyribonukleinsäuren durch nichtradioaktive Verfahren. Der Oligodesoxyribonukleotidteil der bestimmten und zu einem ADN-Ziel-fragment homologen Sequenz liefert die Stabilisierungsenergie und stellt die Hybridisierung mit dem nachzuweisenden ADN-Molekül sicher. Der Teil, der die Reaktivität liefert, die den direkten oder indirekten Nachweis des Hybrids ermöglicht, kann am 5' (OH)- und (oder) 3' (OH)-Ende der Nukleinsäuresequenz eingeführt werden. In diesem präzisen Beispiel wird der für den Nachweis verantwortliche Teil im wesentlichen bei 3' (OH) der Nukleinsäuresequenz eingeführt. Der für den Nachweis verantwortliche Teil wird bei 3' (OH) der Oligonukleotidkette eingeführt, indem zuerst eine Reihe von Kondensationen der Derivate 1 und 4 auf einem festen CPG-Träger 24 im automatischen Oligonukleotidsynthesator durchgeführt wird. Wenn die gewünschte Sequenz an chemischen Zweigen und primären Aminzweigen im automatischen Synthesator aufgebaut worden ist, fährt man infolge der aufgebauten Struktur mit der Konstruktion der Oligonukleotidkette fort. Die Kondensationen der Phosphoramidite 1 und 4 im automatischen Oligonukleotidsynthesator werden unter Verwendung der gleichen Reaktionszyklen, die bei der Nukleinsäuresequenzsynthese verwendet wurden, durchgeführt. Jedoch werden die Kondensationszeiten hinsichtlich des Derivats 4 anstelle von 25 Sekunden beim typischen Zyklus auf 10 Minuten ausgedehnt. Nach der Abspaltung der 3'-modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger und der Entfernung der Schutzgruppen von den Phosphaten und Basen der Oligonukleotidkette wird der Teil, der die Reaktivität liefert, die für den Nachweis verantwortlich ist, durch eine kovalente chemische Bindung eingeführt. Von den verschiedenen Molekülen, die für den Nachweis erforderlich

07.10.96

chen Eigenschaften besitzen, setzt man bevorzugt Biotin, Digoxigenin, Fluorescein, Peroxidase und alkalische Phosphatase ein. Diese entsprechend aktivierten Moleküle werden an der Oligonukleotidkette auf der Ebene der primären Amine, die hierzu aufgrund ihrer Nukleophilie eingeführt werden, fixiert.

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4 stammenden Aminzweig mit N und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die bei 3' (OH) modifizierten Oligomere, die hergestellt wurden, die folgenden:

TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNS	<u>31</u>
TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNS	<u>32</u>
TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNSNS	<u>33</u>
TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNSNSNS	<u>34</u>

Nach Abspaltung der derart modifizierten Oligonukleotidketten von ihrem festen Träger und Entfernung der Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten werden die vier Oligonukleotide durch Kapillarelektrophorese analysiert (Fig. 4).

Nach dem Entschützen der primären Amine werden die Sonden 31, 32, 33 und 34 biotinyliert. Die erhaltenen biotinylierten Sonden 35, 36, 37 und 38 werden durch Kapillarelektrophorese analysiert (Fig. 4).

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4, gefolgt von einer Biotinylierung stammenden Aminzweig mit B und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die erhaltenen, in 3' (OH) mono- oder polybiotinylierten Sonden die folgenden:

TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBS	<u>35</u>
TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBS	<u>36</u>
TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBS	<u>37</u>
TTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBSSBS	<u>38</u>

07.10.88

Verfahren zur Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die in 3' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von Aminzweigen unterbrochen sind, Synthese der Sonden 31, 32, 33 und 34

Man stellt gleichzeitig die vier Sonden 31, 32, 33 und 34 in einem automatischen ADN-Synthesator ABI 394 her. Hierzu füllt man in vier Reaktoren 6,6 mg (0,2 μ Mol) des mit 30,3 μ Mol/g funktionalisierten CPG-Trägers 24. Das Derivat 1 und das Derivat 4 werden in wasserfreiem Acetonitril mit einer Konzentration von 0,1 M gelöst und in den Synthesator, an den für nichttypische Phosphoramidite vorgesehenen Stellen hineingegeben. Der Synthesator wird programmiert, um mit den Fixierungszyklen der Phosphoramidite 1 und 4 nach den jeweiligen Sequenzen 31, 32, 33 und 34 zu beginnen und dann mit den Nukleotidphosphoramiditen, der Synthese einer zu einer Zielsequenz komplementären Nukleinsäuresequenz, fortzufahren:

5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA3'

Nach der automatischen Synthese der Biopolymere 31, 32, 33 und 34 werden die derart modifizierten Oligonukleotidketten von den CPG-Trägern durch 4 15minütige aufeinanderfolgende Behandlungen mit 500 μ l 32%igem NH₄OH abgespalten. Die erhaltenen ammoniakalischen Lösungen werden für 5 Stunden auf 55°C erwärmt. Diese zweite Behandlung hat zum Ziel, von den Basen und Phosphaten der Oligonukleotidketten die Schutzgruppen zu entfernen. Die ammoniakalischen Lösungen werden lyophilisiert und die vier Rückstände werden einer molekularen Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid unterzogen.

Verfahren zur Biotinylierung der gemischten Oligodesoxyribonukleotidmoleküle, die bei 3' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von Aminzweigen unterbrochen sind, Herstellung der biotinylierten Sonden 35, 36, 37 und 38

In einem Eppendorfgefäß löst man 20 μ l der aminierten Sonde 31, 32, 33 oder 34 in 120 μ l 0,01 M Phosphatpuffer mit pH 7,5. Man gibt eine Lösung von 20 mg Sulfosuccinimidyl-6-biotinamidocaproat in 240 μ l Dimethylformamid zu. Man inkubiert 16 Stunden bei Raumtemperatur. Jede Lösung wird molekularer Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) unterzogen und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid. Die biotinylierten Sonden 35, 36, 37 und 38, genauso wie die entsprechenden aminierten Sonden 31, 32, 33 und 34 werden mittels Kapillarelektrophorese analysiert; Mikro-Gel₁₀₀-Säule, Innendurchmesser 50 μ m, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, 75 mM Tris-Phosphatpuffer - 10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL VIII: Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die bei 3' (OH) und 5' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von aminierten Zweigen unterbrochen sind, die für den Nachweis von ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren verwendbar sind.

Die gemischten Molekülzusammensetzungen mit einem Oligodesoxyribonukleotidteil und einem anderen Teil, der charakteristische chemische Eigenschaften besitzt, ermöglicht leicht und schnell den Nachweis von Zielsdesoxyribonukleinsäuren durch nichtradioaktive Verfahren. Der Oligodesoxyribonukleotidteil der bestimmten und zu einem ADN-Zielfragment homologen Sequenz liefert die Stabilisierungsenergie

und stellt die Hybridisierung mit dem nachzuweisenden ADN-Molekül sicher. Der Teil, der die Reaktivität liefert, die den direkten oder indirekten Nachweis des Hybrids ermöglicht, kann am 5' (OH)- und (oder) 3' (OH)-Ende der Nukleinsäuresequenz eingeführt werden. In diesem präzisen Beispiel wird der für den Nachweis verantwortliche Teil beiderseits gleichzeitig bei 5' (OH) und bei 3' (OH) in die Oligonukleotidkette eingeführt.

Der für den Nachweis verantwortliche Teil wird bei 3' (OH) der Oligonukleotidkette eingeführt, indem zuerst eine Reihe von Kondensationen der Derivate 1 und 4 auf einem festen CPG-Träger 24 im automatischen Oligonukleotidsynthesator durchgeführt wird. Wenn die gewünschte Sequenz an chemischen und primären Aminzweigen im automatischen Synthesator aufgebaut worden ist, fährt man im Anschluß an die aufgebaute Struktur mit der Konstruktion der Oligonukleotidkette fort.

Nach der Oligonukleotidkette wird der Synthesator programmiert, um mit den Fixationszyklen in 5' der Einheiten 1 und 4 fortfahren. Die Kondensationen der Phosphoramidite 1 und 4 im automatischen Oligonukleotidsynthesator werden unter Verwendung der gleichen Reaktionszyklen, die bei der Nukleinsäuresequenzsynthese verwendet werden, durchgeführt. Jedoch werden die Kondensationszeiten hinsichtlich des Derivats 4 anstelle von 25 Sekunden beim typischen Zyklus auf 10 Minuten ausgedehnt.

Nach der Abtrennung der 3' (OH)- und 5' (OH)-modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger und der Entfernung der Schutzgruppen von den Phosphaten und Basen der Oligonukleotidkette wird der Teil, der die Reaktivität liefert, die für den Nachweis verantwortlich ist, durch eine kovalente chemische Bindung eingeführt. Von den verschiede-

07.10.90

nen Molekülen, die für den Nachweis erforderlichen Eigenschaften besitzen, setzt man bevorzugt Biotin, Digoxigenin, Fluorescein, Peroxidase und alkalische Phosphatase ein. Diese entsprechend aktivierten Moleküle werden an der Oligonukleotidkette auf der Ebene der primären Amine, die hierzu aufgrund ihrer Nukleophilie eingeführt werden, fixiert.

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4 stammenden Aminzweig mit N und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die bei 3' (OH) und 5' (OH) modifizierten Oligomere, die hergestellt wurden, die folgenden:

NSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNS 39

NSSNSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNS 40

NSSNSSNSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNS 41

NSSNSSNSNSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNS 42

Nach Abspaltung der derart modifizierten Oligonukleotidketten von ihrem festen Träger und Entfernung der Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten werden die vier Oligonukleotide mittels Kapillarelektrophorese analysiert (Fig. 5).

Die Sonden 39, 40, 41 und 42 sind nun biotinyliert; die erhaltenen biotinylierten Sonden 43, 44, 45 und 46 werden mittels Kapillarelektrophorese analysiert (Fig. 5).

Wenn man den aus der Kondensation der Einheit 4, gefolgt von einer Biotinylierung stammenden Aminzweig mit B und den aus der Kondensation der Einheit 1 stammenden chemischen Zweig mit S bezeichnet, sind die erhaltenen, in 3' (OH) und in 5' (OH) mono- oder polybiotinylierten Sonden die folgenden:

BSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBS	<u>43</u>
BSSBSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBS	<u>44</u>
BSSBSSBSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBS	<u>45</u>
BSSBSSBSSBSSTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBS	<u>46</u>

Verfahren zur Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die in 3' (OH) und 5' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von Aminzweigen unterbrochen sind, Synthese der Sonden 39, 40, 41 und 42

Man stellt gleichzeitig die vier Sonden 39, 40, 41 und 42 in einem automatischen ADN-Synthesator ABI 394 her. Hierzu füllt man in vier Reaktoren 6,6 mg (0,2 µMol) des mit 30,3 µMol/g funktionalisierten CPG-Trägers 24. Das Derivat 1 und das Derivat 4 werden in wasserfreiem Acetonitril mit einer Konzentration von 0,1 M gelöst und in den Synthesator, an den für nichttypische Phosphoramidite vorgesehenen Stellen hineingegeben.

Der Synthesator wird programmiert, um mit den Fixierungszyklen der Phosphoramidite 1 und 4 nach den jeweiligen Sequenzen 39, 40, 41 und 42 zu beginnen und dann mit den Nukleotidphosphoramiditen, der Synthese einer zu einer Zielsequenz komplementären Nukleinsäuresequenz, fortzufahren:

5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA3'

und schließlich die Kondensationszyklen der Einheiten 1 und 4 bei 5' der Nukleinsäurekette fortzuführen.

Nach der automatischen Synthese der Biopolymere 39, 40, 41 und 42 werden die derart modifizierten Oligonukleotidketten von den CPG-Trägern durch 4 15minütige aufeinanderfolgende Behandlungen mit 500 µl 32%igem NH₄OH abgespalten. Die er-

07.10.90

haltenen ammoniakalischen Lösungen werden für 5 Stunden auf 55°C erwärmt. Diese zweite Behandlung hat zum Ziel, die Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten der Oligonukleotidketten zu entfernen. Die ammoniakalischen Lösungen werden lyophilisiert und die vier Rückstände werden einer molekularen Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid unterzogen.

Verfahren zur Biotinylierung der gemischten Oligodesoxyribonukleotidmoleküle, die bei 3' (OH) und 5' (OH) eine lineare Verflechtung von chemischen Zweigen tragen, die von Aminzweigen unterbrochen sind, Herstellung der biotinylierten Sonden 43, 44, 45 und 46

In einem Eppendorfgefäß löst man 20 DO der Sonde 39, 40, 41 oder 42 in 120 µl 0,01 M Phosphatpuffer mit pH 7,5. Man gibt eine Lösung von 30 mg Sulfosuccinimidyl-6-biotinamidocaproat in 360 µl Dimethylformamid zu. Man inkubiert 16 Stunden bei Raumtemperatur. Jede Lösung wird einer molekularen Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) unterzogen und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid. Die biotinylierten Sonden 43, 44, 45 und 46, genauso wie die entsprechenden aminierten Sonden 39, 40, 41 und 42 werden mittels Kapillarelektrophorese analysiert; Mikro-Gel₁₀₀-Säule, Innendurchmesser 50 µm, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, 75 mM Tris-Phosphatpuffer - 10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL IX: Verwendung der in den Beispielen IV, VII und VIII beschriebenen biotinylierten Sonden in der Hybridisierung auf einem festen Träger - Nachweisgrenzen

Um die Vorteile der vorliegenden Erfindung aufzuzeigen, wurden die in 5' (OH) polybiotinylierten Sonden 20, 21, 22 und 23, die in 3' (OH) polybiotinylierten Sonden 35, 36, 37 und 38 sowie die in 3' (OH) und 5' (OH) polybiotinylierten Sonden 43, 44, 45 und 46 bei der Hybridisierung getestet, um ihr Verwendungspotential bei der Diagnostik zu studieren.

Im allgemeinen findet die Hybridisierung zwischen einem mit seinem 5' (OH)-Ende auf einem festen Kunststoffträger fixierten Oligonukleotid (30 mer), und den zu seinem 3' (OH)-Ende komplementären Testsonden (23 mer) statt. Jeder feste Träger (Röhrchen) ist größtenteils mit 10 ng des zu den Testsonden komplementären Oligonukleotids (30 mer) versehen, was ungefähr 10^{12} Kopien entspricht. Jedes oben erwähnte biotinylierte Oligonukleotid wird 8 verschiedenen Hybridisierungen unterzogen, ausgehend von 1 pg markiertem Oligonukleotid ($\sim 10^8$ Kopien), was bei den Verdünnungen 1/3 von einer Küvette zur anderen zu bis zu 300 atg (3×10^4 Kopien) führt. Nach der Hybridisierung erfolgt der Nachweis durch Chemolumineszenz (CSPD-Tropix), die Anzeige erfolgt in einem Luminometer.

Die in Schema IV wiedergegebenen Ergebnisse betreffen die Hybridisierung der in 5' (OH) polybiotinylierten Sonden 20, 21, 22 und 23 mit dem 30 mer-Komplementären, fixiert auf Plastikröhren.

07.10.90

Schema IV

OLIGO	Biotinanzahl	Nachweisgrenze	
		fg	Kopienanzahl
20	1 5' (OH)	30	3×10^6
21	2 "	30	3×10^6
22	3 "	30	3×10^6
23	4 "	3	3×10^5

Für die in 3' (OH) polybiotinylierten Sonden 35, 36, 37 und 38 sind die Hybridisierungsergebnisse in Schema V wiedergegeben.

Schema V

OLIGO	Biotinanzahl	Nachweisgrenze	
		fg	Kopienanzahl
35	1 3' (OH)	30	3×10^6
36	2 "	10	10^6
37	3 "	3	3×10^5
38	4 "	3	3×10^5

Hinsichtlich der in 5' (OH) und der in 3' (OH) polybiotinylierten Sonden 43, 44, 45 und 46 sind die Ergebnisse in Schema VI wiedergegeben.

Schema VI

OLIGO	Biotinanzahl	Nachweisgrenze	
		fg	Kopienanzahl
43	2 3' + 5' (OH)	30	3×10^6
44	4 "	10	10^6
45	6 "	3	3×10^5
46	8 "	1	10^5

Hybridisierungsverfahren einer mono- oder polybiotinylierten Sonde (23 mer) mit einem komplementären Oligomer (30 mer), fixiert auf einem Kunststoffröhrenchen.

Die mit komplementärem Oligonukleotid (30 mer) überzogenen Röhrenchen werden zunächst 1 Stunde bei 37°C mit 200 µl einer 5%igen Lösung lyophilisierter Magermilch in TBS 1x, die eine Spur Azid enthält, gesättigt. Die Röhrenchen werden dann 2 Stunden bei 50°C mit Hybridisierungspuffer (100 µl): 5xDenhardt's, 6xSSC, 0,1% SDS, 100 µg/ml DNA-Salmsperma vorhybridisiert.

Für jedes zu testende Oligonukleotid führt man 8 Versuche mit den nachfolgenden Mengen durch (in 100 µl Hybridisierungspuffer): 1 pg (10^8 Kopien), 300 fg, 100 fg (10^7 Kopien), 30 fg, 10 fg (10^6 Kopien), 3 fg, 1 fg (10^5 Kopien), 0,3 fg. Es werden ebenfalls eine Reihe von 8 Röhrenchen mit einem nichtkomplementären und nichtbiotinylierten Oligomeren und 8 Röhrenchen ohne Oligonukleotid hergestellt.

Die ganzen Röhrenchen werden 2 Stunden bei 50°C hybridisiert, dann wird jedes Röhrenchen dreimal für 10 Minuten bei 50°C mit einer SSC 6x-Lösung gewaschen, und dann werden sie einmal für 5 Minuten mit dem Puffer I gewaschen.

Puffer I: 0,1 M Tris, 0,2 mM MgCl₂, 0,05% Triton, 1 M NaCl.

Man stellt dann eine Lösung von alkalischer Streptavidin-Phosphatase her (geliefert mit dem Tropix-Set): 1 µl der Setlösung in 5500 µl des Puffers I. Man gibt 100 µl dieser Lösung in jedes Röhrenchen und lässt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und wäscht anschließend jedes Röhrenchen sechsmal mit dem Puffer I. Man stellt die Lösung des Chemolumineszenzagens, des CSPD: 3-(4-Methoxyspiro{1,2-

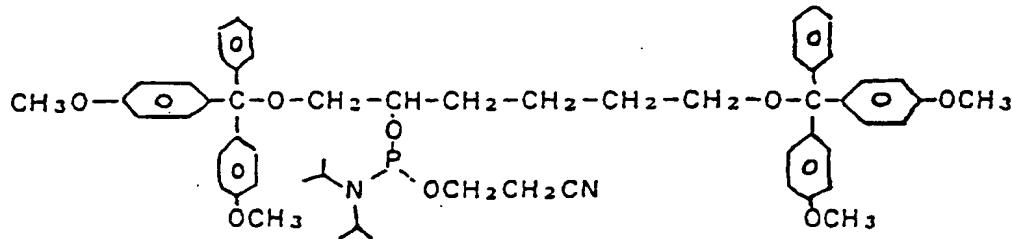
dioxethan-3,2'-tricyclo[3.3.1.1.]chlordecan]-4-yl)-phenylphosphat her.

Die Lösung wird wie folgt hergestellt: 80 µl CSPD (Tropix), 500 µl "Emerald" (Tropix) und 4420 µl des Entwicklungspuffers.

Entwicklungspuffer: 0,1 M Diethylamin, 1 mM MgCl₂, 0,02% Natriumazid. Man gibt 100 µl dieser Lösung in jedes Röhrchen und lässt 45 Sekunden inkubieren, dann liest man im Luminometer ab.

BEISPIEL X: Herstellung von 1,6-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-O-(N,N'-diisopropyl-amino-2-cyanoethoxyphosphino)-1,2,6-hexantriol

Das Derivat 1,6-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-O-(N,N'-diisopropyl-amino-2-cyanoethoxyphosphino)-1,2,6-hexantriol 47 entspricht der Formel:



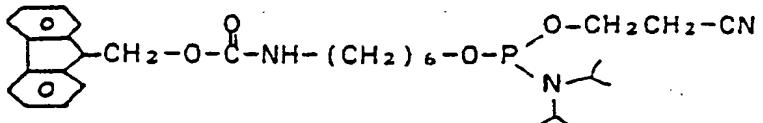
47

Der nachfolgende Ansatz betrifft die Herstellung eines nichtnukleotiden Synthons, das inzwischen die chemischen Gruppen trägt, die dessen Einführung bei 5' (OH) in eine Oligonukleotidkette oder ein nichtnukleotides Polymer, dessen Monomere durch eine Phosphodiesterbindung verbunden sind, unter den üblichen automatischen ARN- oder ADN-Synthesebedingungen ermöglichen.

Dieses Synthon hat den Vorteil, dem Verwender ein Instrument zu liefern, das die Einführung von verzweigten Ketten in 5'(OH) einer Nukleinsäuresequenz ermöglicht, ohne die automatische oder manuelle Syntheseroutine zu verlassen.

In der Tat besitzt es zwei durch eine Dimethoxytritylgruppe geschützte primäre Alkoholfunktionen, und damit dupliziert es bei jedem Kondensationszyklus die Zahl der Stellen für die nachfolgende Kondensation.

Die Zahl der Kondensationsstellen zu vervielfachen ist interessant, weil die Möglichkeit besteht, über diese Stellen am Ende der Synthese Alkylketten einführen zu können, die eine primäre Amingruppe tragen. Dieses Einführen ist am Ende der Synthese durch Kondensation des Derivats 48 an den erzeugten primären Alkoholstellen möglich.



48

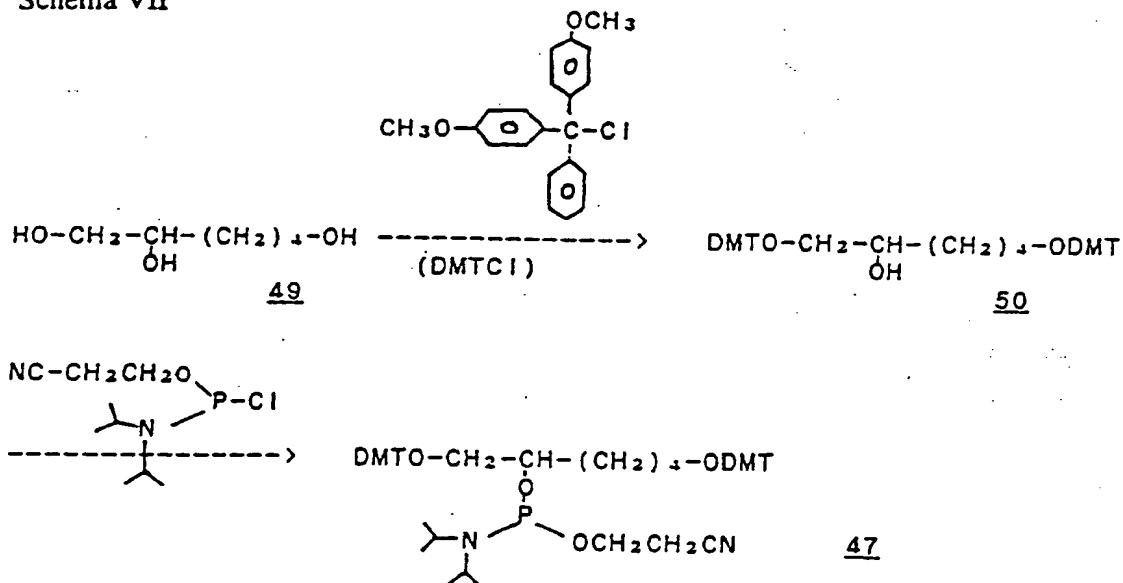
Das Derivat 48 ist in der Literatur bekannt, ist aber weder beansprucht noch beschrieben. Hinsichtlich der Verbindung 47 sind die Gruppen 4,4'-Dimethoxytrityl und 2-Cyanoethoxy-diisopropylaminophosphoramidit für eine Synthese der Phosphoramidite, insbesondere auf einem festen Träger, geeignet.

Der Reaktionsweg, um die in Schema VII dargestellte Verbindung 47 zu erhalten, umfaßt die nachfolgenden Schritte:

07.10.96

- 1) Selektiver Schutz der zwei primären Alkohole von 1,2,6-Hexantriol 49 mit Dimethoxytritylchlorid (DMT), das bei saurem pH instabil ist.
- 2) Phosphorylierung des sekundären Alkohols 50. Das gezeigte Phosphoramiditbeispiel in Schema VII ist nicht beschränkend; man kann auch die Synthese eines Phosphatsterns oder -diesters oder eines Phosphonats in Betracht ziehen.

Schema VII



Verfahren zur Herstellung von 1,6-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1,2,6-hexantriol 50

Man gibt 1,34 g 1,2,6-Hexantriol 49 (10^{-2} Mol) in einen 50 cm³-2-Halskolben. Man setzt unter Argonatmosphäre und fügt dann 20 cm³ wasserfreies Pyridin zu. Dann gibt man in die Lösung 8,45 g ($2,5 \times 10^{-2}$ Mol) Dimethoxytritylchlorid. Man röhrt 2 Stunden bei Raumtemperatur. Man hydrolysiert die Reaktionsmischung (25 cm³ 5%iges NaHCO₃) und extrahiert mit

Dichlormethan ($2 \times 50 \text{ cm}^3$). Die erhaltene organische Phase wird dreimal mit Wasser gewaschen, dann einmal mit einer gesättigten wässerigen Natriumchlorid-Lösung, dann wird sie über MgSO_4 getrocknet, dann filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft (Rotationsverdampfer, $P = 20 \text{ mm Hg}$). Das restliche Pyridin wird anschließend durch azeotropes Abdampfen unter reduziertem Druck mit Toluol entfernt. Das restliche Toluol wird dann anschließend durch azeotropes Abdampfen unter reduziertem Druck mit Dichlormethan entfernt. Der erhaltene Rückstand wird über eine Silikasäule von Merck 9385 gereinigt - Elutionsmittel Ether 0 → 40 - Hexan 100 → 60. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel zu Beginn 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung gewinnt man 4,5 g ($6,1 \times 10^{-3} \text{ Mol}$, Ausbeute 61%). Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) auf Merck-Platten 5735 (Silikagel 60F₂₅₄) Elutionsmittel Ether 4 - Hexan 6, Rf: 0,3.

Verfahren zur Herstellung von 1,6-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-O-(N,N'-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphino)-1,2,6-hexantriol 47

Man führt 1,1 g der Verbindung 50 ($1,5 \times 10^{-3} \text{ Mol}$) in einen 25 cm^3 -2-Halskolben ein. Man setzt unter Argonatmosphäre und fügt dann 6 cm^3 wasserfreies Tetrahydrofuran und 0,84 cm^3 Diisopropylethylamin zu. Man gibt dann mit einer Spritze tropfenweise 0,45 cm^3 ($2 \times 10^{-3} \text{ Mol}$) 2-Cyanoethoxydiisopropylaminochlorphosphin zur Reaktionsmischung zu. Nach 10 Reaktionsminuten erscheint inmitten der Reaktionsmischung ein beträchtlicher Niederschlag (Chlorhydrat von Diisopropylethylamin). Man hydrolysiert die Reaktionsmischung (15 cm^3 5%iges NaHCO_3) und extrahiert mit Dichlormethan ($2 \times 30 \text{ cm}^3$). Die erhaltene organische Phase wird mit Wasser ($3 \times 20 \text{ cm}^3$) und dann mit einer gesättigten wässerigen Natriumchlorid-Lösung ($1 \times 20 \text{ cm}^3$) gewaschen. Sie wird über MgSO_4

getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft (Rotationsverdampfer, $P = 20$ mm Hg). Der Rückstand wird über eine Silikasäule von Merck 9385 gereinigt - Elutionsmittel Ethylacetat 3 - Hexan 7. Das Silika wird zuvor in Suspension neutralisiert, wobei das Elutionsmittel 1% DIEA enthält. Nach der Reinigung erhält man 1,2 g von 47. Ausbeute 84%.

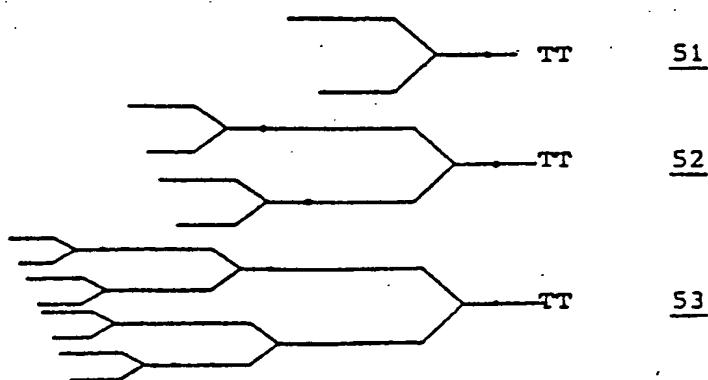
Dünnschichtchromatographie (C.C.M.) auf Merck-Platten 5735 (Silikagel 60F₂₅₄) Elutionsmittel Ethylacetat 3 - Hexan 7, Rf: 0,6.

BEISPIEL XI: Studium der Reaktivität der Verbindung 47

Das nichtnukleotide Phosphoramidit 47 kann eingesetzt werden, um eine verzweigte Kette bei 5' (OH) einer Nukleinsäuresequenz einzuführen: Interessant bei 47 ist eine Verdopplung der Anzahl der Kondensationsstellen in jedem Kondensationsschritt. Am Ende der Synthese ist es dann möglich, über die derart erzeugten Kondensationsstellen ein primäres Amin tragende Alkylketten einzuführen. Die Einführung der primären Amine wird durch Endkondensation des Derivats 48 an den erzeugten n primären Alkoholstellen durchgeführt.

In einem ersten Abschnitt wird das Derivat 47 in einer automatischen Oligonukleotidsynthesevorrichtung bei 5' (OH) eines auf einem in der automatischen Synthese typischen festen Träger (CPG-Träger: Controlled Porous Glass) fixierten Dimeren Thymidin-Thymidin T-T kondensiert.

Wenn man durch  eine aus der Kondensation einer Einheit 47 stammende Einheit darstellt, in der • ein Phosphat darstellt, können die bei 5' (OH) modifizierten Dimeren TT, die synthetisiert wurden, in folgender Art und Weise dargestellt werden:



Wie die Kapillarelektrophoreseanalysen zeigen (Figur 6), wird das Derivat 47 erfolgreich bei 5' (OH) eines Elongationsoligonukleotids (vgl. 51) fixiert, ebenso wird es auf zwei nach einer ersten Kondensation von 47 auf TT (vgl. 52) erzeugten Kondensationsstellen fixiert und auch auf den nach zwei aufeinanderfolgenden Kondensationen von 47 auf TT (vgl. 53) erzeugten vier Kondensationsstellen.

In Anbetracht, daß man die Zahl der Kondensationsstellen bei jedem Zyklus verdoppelt, ist die Lösung von 47, die verwendet wird, um gleichzeitig die Derivate 51, 52 und 53 im automatischen Oligonukleotidsynthesator herzustellen, 0,4 M (typische Bedingungen 0,1 M); außerdem wird die Kupplungszeit auf 10 Minuten ausgedehnt (typische Bedingungen 25 Sekunden).

Diese Ergebnisse, genauso wie die Kondensationsreaktionen, zeigen, daß die Oxidation, das Kappen und Abspalten vom festen Träger nach der Synthese wirksam sind, und die Polymere 51, 52 und 53 nicht abbauen.

Außerdem ist es in der Oligonukleotidsynthese möglich, die Lösung zur Entfernung der Dimethoxytritylschutzgruppe wiederzugewinnen und die Intensität der Orangefärbung des Kations zu messen, um die Ausbeute jeder Kondensation zu be-

stimmen. Diese Messungen werden für die Synthese von 53 bei jedem Zyklus durchgeführt; sie geben gute Ausbeuten an, wie die unten angegebenen Ergebnisse zeigen (Schema VIII).

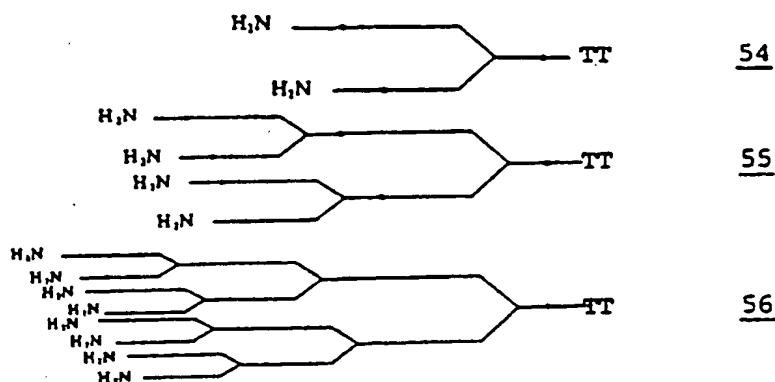
Schema VIII

1. Kondensation (T)	1 DMT	$A_{497}:0,9$	Ausbeute: 100% (zuge- wiesen)
2. Kondensation	2 DMT	$A_{497}:1,7$	Ausbeute: 95%
3. Kondensation	4 DMT	$A_{497}:3,4$	Ausbeute: 95%
4. Kondensation	8 DMT	$A_{497}:5,3$	Ausbeute: 77%

In einem zweiten Abschnitt wird eine Anzahl x an Kondensationen von 47 ($x=1 \rightarrow 3$) an einem auf einen für automatische Synthesen typischen festen Träger (CPG-Träger, Controlled Porous Glass) fixierten Thymidin-Thymidin-Dimeren TT durchgeführt, dann wird mit einer Kondensation von 48 an die erzeugten n Kondensationsstellen geendet, um für die spätere Fixierung von n Markern n primäre Aminstellen einzuführen.

Wenn man mit  eine aus der Kondensation einer Einheit 47 stammende Einheit darstellt, in der • ein Phosphat darstellt,

und mit $\text{NH}_2-\bullet$ die aus der Kondensation einer Einheit 48 resultierende Einheit, in der • ein Phosphat darstellt, sind die modifizierten Dimere TT, die man hergestellt hat, die folgenden:



Wie zum Beispiel die Kapillarelektrophoreseanalysen für die Verbindung 55 zeigen (Fig. 7) wird das Derivat 48 wirksam an den erzeugten 4 Kondensationsstellen im Polymer 52 fixiert, da man im Elektropherogramm von 55 nur eine Spur von 52 findet.

In Anbetracht dessen, daß man bei jedem Zyklus die Anzahl der Kondensationsstellen verdoppelt, ist die Lösung von 47, die verwendet wird, um gleichzeitig die Verbindungen 54, 55 und 56 im automatischen Oligonukleotidsynthesator herzustellen, 0,4 M und die Lösung von 48 ist 0,8 M (typische Bedingungen 0,1 M). Außerdem wird die Kupplungszeit für die Kondensationen von 47 und 48 auf 10 Minuten ausgedehnt (typische Bedingungen 25 Sekunden).

Kupplung der Derivate 47 und 48 in fester Phase mit einem auf einem festen CPG-Träger fixierten Thymidin-Thymidin-Dimeren

Das Phosphoramidit 47 wird in wasserfreiem Acetonitril in einer Konzentration von 0,4 M gelöst und das Phosphoramidit 48 wird in der gleichen Lösung in einer Konzentration von 0,8 M gelöst. Sie werden in den automatischen Oligonukleotidsynthesator an den für die nichttypischen Phosphoramidite vorgesehenen Stellen eingefüllt. Für die Kondensationen

von 47 und 48 sind alle Kondensationsbedingungen die Bedingungen eines Oligonukleotidelongationszyklusses, ausgenommen der Konzentration an Phosphoramidit und der Kupplungszeit. Die Abspaltung des festen Trägers wird unter üblichen Bedingungen durchgeführt (32%iges NH₄OH) und das Endprodukt wird mit einer Ausbeute erhalten, die vergleichbar zu den üblicherweise in Oligonukleotidsynthesen erhaltenen ist. Die Polymere 51, 52, 53, 54, 55 und 56 werden mit Kapillarelektronenphorese ABI 270 A analysiert; Mikrogel₁₀₀-Kapillarsäule, Innendurchmesser 50 µm, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, 75 mM Tris-Phosphatpuffer, 10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL XII: Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die bei 5'(OH) eine verzweigte Verflechtung von Alkylketten tragen, die in Aminketten enden, welche für den Nachweis der ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren verwendbar sind.

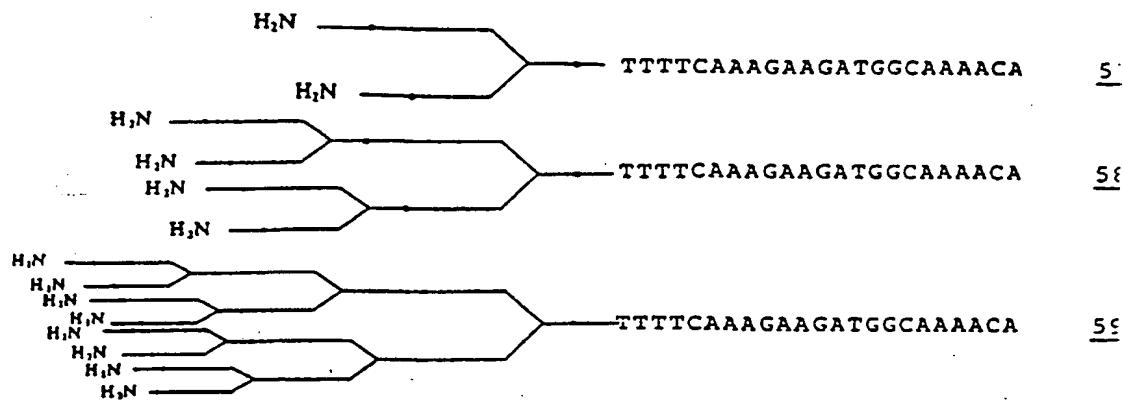
Die Synthese und der Einsatz gemischter Moleküle, die aus einem Oligodesoxynukleotidteil und einem anderen, charakteristische chemische Eigenschaften besitzenden Teil zusammengesetzt sind, ermöglichen leicht und schnell den Nachweis der Zieldesoxyribonukleinsäuren durch nichtradioaktive Verfahren. Der Oligodesoxyribonukleotidteil der bestimmten und zu einem ADN-Zielfragment homologen Sequenz liefert die Stabilisierungsenergie und stellt die Hybridisierung mit dem nachzuweisenden ADN-Molekül sicher. Der Teil, der die Reaktivität liefert, die den direkten oder indirekten Nachweis des Hybrids ermöglicht, kann am 5'(OH)- und (oder) 3'(OH)-Ende der Nukleinsäuresequenz eingeführt werden. In diesem präzisen Beispiel wird der für den Nachweis verantwortliche Teil im wesentlichen bei 5'(OH) der Nukleinsäuresequenz eingeführt.

Nach der verwendeten Strategie kann der für den Nachweis verantwortliche Teil nur bei 5' (OH) eingeführt werden. Dies geschieht, indem man eine Reihe von Kondensationen des Phosphoramidits 47 auf der noch auf dem festen Träger fixierten Oligonukleotidkette durchführt, und ihre Basen und Phosphate schützt. Nach der Kondensationsabfolge von 47 ermöglicht eine letzliche Kondensation des Phosphoramidits 48 n primäre Aminfunktionen durch Kondensation von 48 an den durch die aufeinanderfolgenden Kondensationen von 47 erzeugten n Kondensationsstellen (primäre Alkoholstellen) einzuführen.

Die Kondensationen von 47 und 48 werden unter Verwendung der gleichen Reaktionszyklen im automatischen Oligonukleotidsynthesator, wie die für die Synthese der Nukleinsäuresequenz durchgeführt. Obwohl die aufeinanderfolgenden Kondensationen von 47 den Effekt haben, bei jedem Zyklus die Zahl der Kondensationsstellen zu verdoppeln, ist dennoch die eingesetzte Konzentration von 47 0,4 M und die von 48 0,8 M (typische Konzentration 0,1 M). Für die zwei Phosphoramidite 47 und 48 wird die Kupplungszeit anstatt 25 Sekunden des typischen Zyklus auf 10 Minuten ausgedehnt. Nach der Abspaltung der bei 5' modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger und der Entfernung der Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten wird der Teil, der die für den Nachweis verantwortliche Reaktivität liefert, durch eine kovalente chemische Bindung eingeführt. Von den verschiedenen Molekülen, die die für den Nachweis erforderlichen Eigenschaften besitzen, setzt man bevorzugt Biotin, Digoxigenin, Fluorescein, Peroxidase und alkalische Phosphatase ein. Diese entsprechend aktivierten Moleküle werden auf einer Oligonukleotidkette an den aufgrund ihrer Nukleophilie eingeführten primären Aminen fixiert.

Wenn man mit  die aus der Kondensation einer Einheit 47 stammende Einheit darstellt, in der • ein Phosphat darstellt,

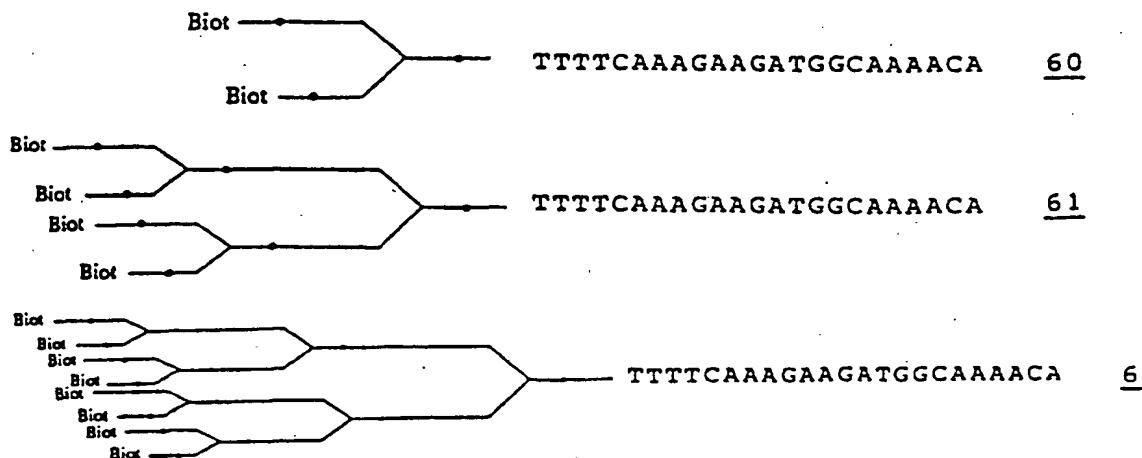
und mit $\text{H}_2\text{N}-$ die aus der Kondensation einer Einheit 48 stammenden Einheit, in der • ein Phosphat darstellt, sind die 5' (OH)-modifizierten Oligomere, die synthetisiert wurden, die folgenden:



Nach der Abspaltung der derart modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger und Entfernung der Schutzgruppen von den Basen und Phosphaten, werden die Sonden 57, 58 und 59 biotinyliert, um zu den entsprechenden biotinylierten Sonden 60, 61 und 62 zu führen (Fig. 8).

Wenn man die aus der Kondensation von Biotin N-Hydroxysuccinimid mit den primären Aminfunktionen stammenden Biotineinheit mit B bezeichnet, sind die erhaltenen bei 5' (OH) polybiotinylierten Sonden die folgenden:

07.10.58



Verfahren zur Herstellung von gemischten Oligodesoxyribonukleotidmolekülen, die bei 5' (OH) eine verzweigte Verflechtung von Alkylketten tragen, die in Aminketten enden

Eine ADN-Sonde wurde mit einer zu einer Zielsequenz komplementären Oligodesoxynukleotidsequenz synthetisiert. Man stellt in fester Phase in einem automatischen ADN-Synthesator ABI 394 gleichzeitig drei identische Sonden (in drei Reaktoren) der Sequenz 5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 3' her. Der Synthesator ist programmiert, um Fixationszyklen bei 5' der Einheiten 47, dann am Ende der Synthese einer Einheit 48 durchzuführen, um jeweils zu den Sonden 57, 58 und 59 zu führen.

Hierzu setzt man 6 mg mit 34 μ Mol/g, entsprechend 0,2 μ Mol Dimethoxytritylbenzoyladenosin funktionalisierten CPG-Träger ein. Die Derivate 47 und 48 werden mit einer Konzentration von 0,4 M für 47 und 0,8 M für 48 in wasserfreiem Acetonitril gelöst. Sie werden an den vorgegebenen Stellen für nichttypische Phosphoramidite in den Synthesator gegeben.

Nach der automatischen Synthese der Biopolymere 57, 58 und 59 werden die derart modifizierten Oligonukleotidketten

durch 4 15minütige aufeinanderfolgende Behandlungen mit 500 μ l 32%igem NH₄OH von den CPG-Trägern abgelöst. Die erhaltenen ammoniakalischen Lösungen werden 5 Stunden bei 55°C erwärmt. Diese zweite Behandlung dient dazu, bei den Basen und Phosphaten der Oligonukleotidketten die Schutzgruppen zu entfernen. Die ammoniakalischen Lösungen werden lyophilisiert, wobei die vier Rückstände einer molekularen Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid unterzogen werden.

Verfahren zur Biotinylierung der gemischten Oligodesoxyribonukleotidmoleküle, die bei 5' (OH) eine verzweigte Verflechtung der Alkylketten tragen, die in Aminketten enden

In einem Eppendorfgefäß löst man 20 DO der aminierten Sonde 57, 58 oder 59 in 120 μ l 0,01 M Phosphatpuffer mit pH 7,5. Man gibt eine Lösung von 20 mg Sulfosuccinimidyl-6-biotinamidocaproat in 240 μ l Dimethylformamid zu. Man inkubiert 16 Stunden bei Raumtemperatur. Jede Lösung wird molekularer Filtrationschromatographie (Gel Sephadex G50) unterzogen und dann einer Gelelektrophorese auf 20%igem Polyacrylamid.

Die Sonden 57, 58, 59, 60, 61 und 62 werden mittels Kapillarelektrophorese auf einem ABI 270 A analysiert; Mikro-Gel₁₀₀-Säule, Innendurchmesser 50 μ m, Länge 50 cm, Spannung 15 kV, 75 mM Tris-Phosphatpuffer - 10% Methanol, pH 7,6.

BEISPIEL XIII: Verwendung der in Beispiel XII beschriebenen biotinylierten Sonden bei der Hybridisierung auf einem festen Träger - Nachweisgrenzen

Um die Vorteile der vorliegenden Erfindung aufzuzeigen, werden die in 5' (OH) polybiotinylierten Sonden 60, 61 und

62 bei der Hybridisierung getestet, um ihr Verwendungspotential bei der Diagnostik zu studieren.

Im allgemeinen findet die Hybridisierung zwischen einem mit seinem 5' (OH)-Ende auf einem festen Kunststoffträger fixierten Oligonukleotid (30 mer), und den zu seinem 3' (OH)-Ende komplementären Testsonden (23 mer) statt. Jeder feste Träger (Röhrchen) ist größtenteils mit 10 ng des zu den Testsonden komplementären Oligonukleotids (30 mer) versehen, was ungefähr 10^{12} Kopien entspricht.

Jedes oben erwähnte biotinylierte Oligonukleotid wird 8 verschiedenen Hybridisierungen unterzogen, ausgehend von 1 pg markiertem Oligonukleotid ($\sim 10^8$ Kopien), was bei den Verdünnungen 1/3 von einer Küvette zur anderen zu bis zu 300 atg (3×10^4 Kopien) führt. Nach der Hybridisierung erfolgt der Nachweis durch Chemolumineszenz (CSPD-Tropix), die Anzeige erfolgt in einem Luminometer.

Die Hybridisierungsergebnisse der Sonden 60, 61 und 62 sind in Schema IX wiedergegeben.

Schema IX

OLIGO	Biotinanzahl	Nachweisgrenze	
		fg	Kopienanzahl
60	2 5' (OH)	10	10^6
61	4 "	10	10^6
62	8 "	3	3×10^5

Hybridisierungsverfahren einer mono- oder polybiotinylierten Sonde (23 mer) mit einem komplementären Oligomer (30 mer), fixiert auf einem Kunststoffröhrchen.

Die mit komplementärem Oligonukleotid (30 mer) überzogenen Röhrchen werden zunächst 1 Stunde bei 37°C mit 200 µl einer Lösung 5%iger lyophilisierter Magermilch in TBS 1x gesättigt, die eine Spur Azid enhält. Die Röhrchen werden dann 2 Stunden bei 50°C mit Hybridisierungspuffer (100 µl): 5xDenhardt's, 6xSSC, 0,1% SDS, 100 µg/ml DNA-Salmsperma vorhybridisiert.

Für jedes zu testende Oligonukleotid führt man 8 Versuche mit den nachfolgenden Mengen durch (in 100 µl Hybridisierungspuffer): 1 pg (10^8 Kopien), 300 fg, 100 fg (10^7 Kopien), 30 fg, 10 fg (10^6 Kopien), 3 fg, 1 fg (10^5 Kopien), 0,3 fg. Es werden ebenfalls eine Reihe von 8 Röhrchen mit einem nichtkomplementären und nichtbiotinylierten Oligomenen und 8 Röhrchen ohne Oligonukleotid hergestellt. Die ganzen Röhrchen werden 2 Stunden bei 50°C hybridisiert, dann wird jedes Röhrchen dreimal für 10 Minuten bei 50°C mit einer SSC 6x-Lösung gewaschen, und dann werden sie einmal für 5 Minuten mit dem Puffer I gewaschen.

Puffer I: 0,1 M Tris, 0,2 mM MgCl₂, 0,05% Triton, 1 M NaCl.

Man stellt dann eine Lösung von alkalischer Streptavidin-Phosphatase her (geliefert mit dem Tropix-Set): 1 µl der Setlösung in 5500 µl des Puffers I. Man gibt 100 µl dieser Lösung in jedes Röhrchen und lässt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, wäscht anschließend jedes Röhrchen sechsmal mit dem Puffer I. Man stellt die Lösung des Chemolumineszenzagens, des CSPD: 3-(4-Methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2'-tricyclo[3.3.1.1.]chlordecan]-4-yl)-phenylphosphat her. Die Lösung wird wie folgt hergestellt: 80 µl CSPD (Tropix), 500 µl "Emerald" (Tropix) und 4420 µl des Entwicklungspuffers.

07.10.58

Entwicklungsbuffer: 0,1 M Diethanolamin, 1 mM $MgCl_2$, 0,02% Natriumazid. Man gibt 100 μl dieser Lösung in jedes Röhrchen, lässt 45 Sekunden inkubieren, bis man im Luminometer abliest.

07-16-98

94 906 099.0
La Region Wallonne

WM/fg/es

Ansprüche

1. Nukleinsäuresonde zum Nachweis eines ADN- oder ARN-Moleküls, umfassend
 - a) einen Oligonukleotid- oder Oligodesoxynukleotidteil, aufgebaut aus
S: einer ADN- oder ARN-Nukleinsäuresequenz, je nach dem nachzuweisenden Molekültyp und
 - b) einen nichtnukleotiden Teil, der chemische Eigenschaften besitzt, die die direkte oder indirekte Fixierung eines oder mehrerer Nachweiseinheiten oder Marker M ermöglichen, die nichtisotopisch durch die Erzeugung von Färbung oder Licht nachweisbar sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil b) gebildet ist von einer Kette aus Phosphateinheiten, die von Alkyleinheiten unterbrochen sind, nämlich
 - b1) bestimmten Alkyleinheiten, die die verschiedenen Phosphatgruppen verbinden und keine besondere Funktionalität zeigen,
 - b2) primäre Aminfunktionen aufweisende Alkyleinheiten, die die Kopplung mit verschiedenen Reagenzien erlauben

ben, um den Nachweis auf direkte oder indirekte Art und Weise zu ermöglichen,

wobei die Einheiten b2) über die Zwischeneinheiten b1) mit dem Teil a) oder der Sequenz S verbunden sind.

2. Nukleinsäuresonde nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil b) in Form einer linearen Kette vorliegt, in der die Einheiten b1) "chemische Zweige" L bilden, die zur Einführung von Zwischenräumen zwischen den Einheiten b2), welche die eigentlichen Marker M bilden, dienen.
3. Nukleinsäuresonde nach Anspruch 2, entsprechend der Formel

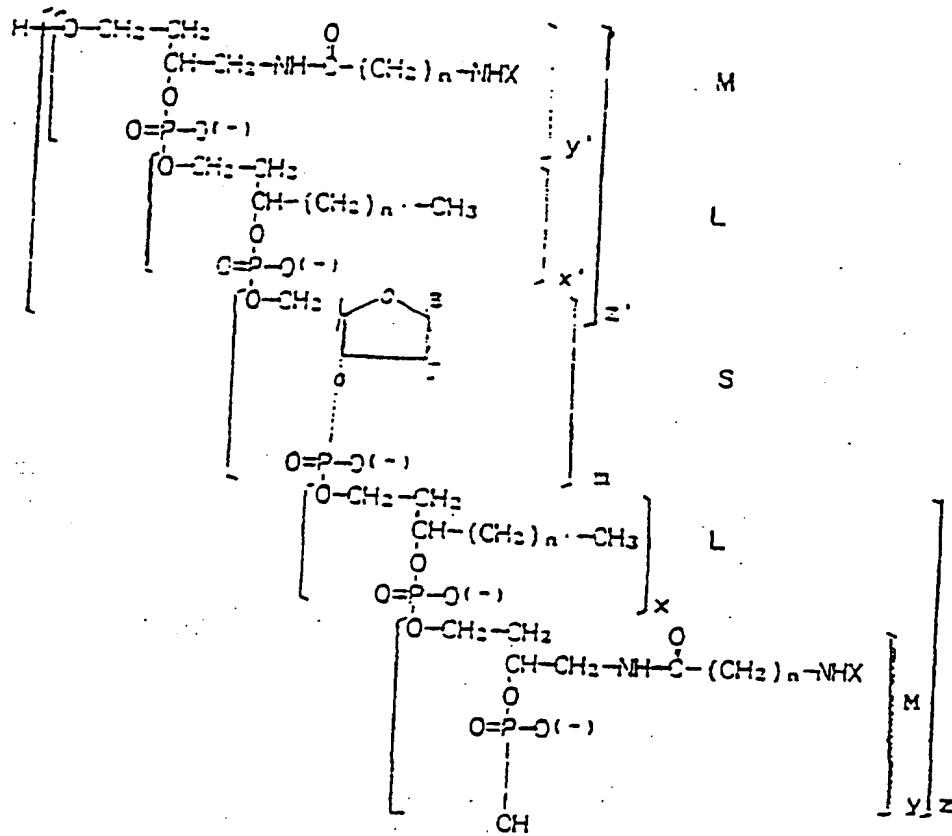
$$[(M)y'-(L)x']z'-S-[(L)x-(M)y]z \quad (I)$$

in der S, L und M die in den Ansprüchen 1 und 2 angegebenen Bedeutungen haben, und

x, x', z, z' Zahlen gleich oder größer 0 sind, mit der Einschränkung, daß z und z' nicht gleichzeitig 0 sind und y und y' Zahlen größer 0 sind.

4. Nukleinsäuresonde nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie der allgemeinen Formel Ia entspricht

07.10.90



(Ia)

in der:

S, L und M die in den Ansprüchen 1 und 2 angegebenen Bedeutungen haben, und in der Sequenz S J die Bedeutung H oder OH hat,
 B eine Nuklein-, Purin- oder Pyrimidin-säurebase bedeutet, je nach den Nukleotiden veränderbar,
 und
 m = 1 bis 1000,

in der Sequenz L

x und $x' = 0$ bis 100

$n' = 0$ bis 20

in der Sequenz M

y und $y' = 1$ bis 100

$n = 2$ bis 20 ist,

X den eigentlichen Marker bezeichnet, der:
entweder ein direkter Marker sein kann, in welchem Fall er aus den Enzymen wie alkalische Phosphatase, Peroxidase und Fluorescein ausgewählt ist, die in der Lage sind, in Gegenwart eines Substrats eine Färbung oder Licht zu erzeugen,

oder ein indirekter Marker sein kann, in welchem Fall er aus den Haptenen, wie dem Biotin oder dem Digoxigenin ausgewählt ist, die in der Lage sind, durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkannt zu werden und

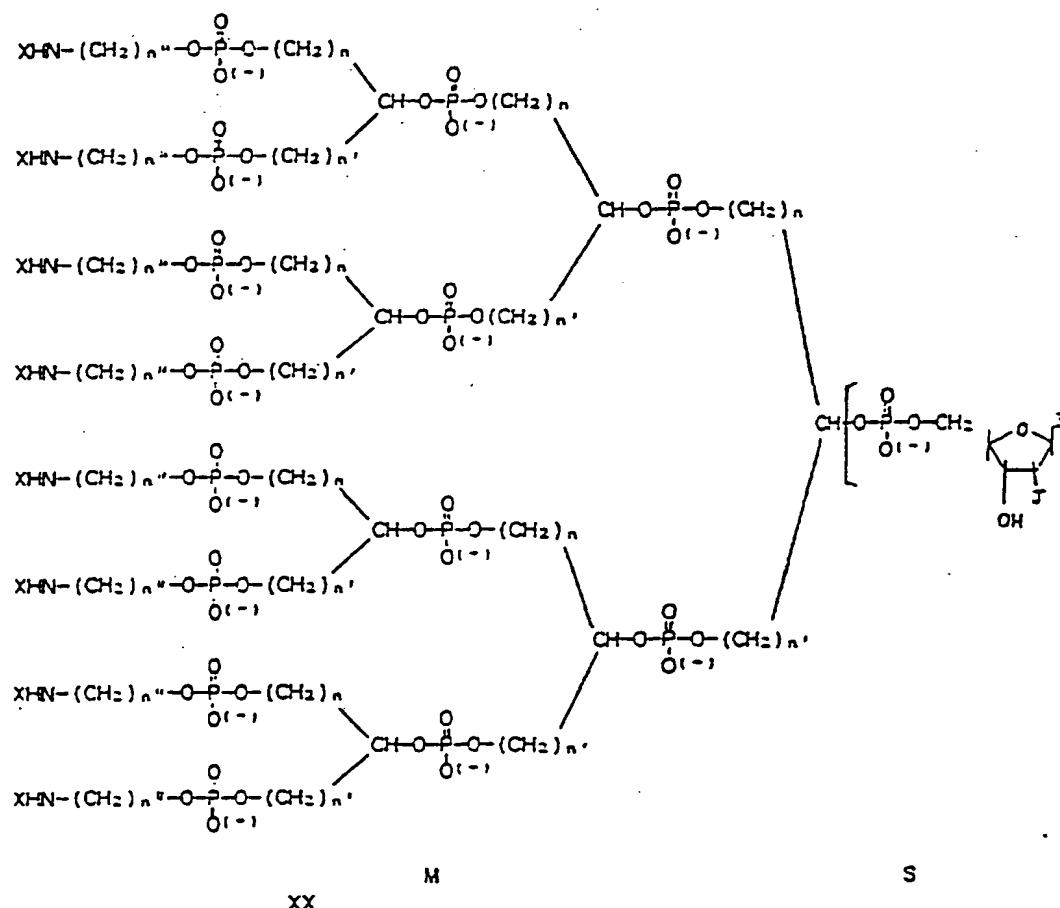
wobei das für den Nachweis der Sonde verantwortliche Element LM eingeführt werden kann
bei 5' (OH), wenn $z' \neq 0$ und $z = 0$
oder bei 3' (OH), wenn $z' = 0$ und $z \neq 0$
oder gleichzeitig bei 5' (OH) und bei 3' (OH), wenn $z' \neq 0$ und $z \neq 0$,

wobei z und z' im allgemeinen = 0 bis 100 sind.

07.10.96

5. Nukleinsäuresonde nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der den Marker M bildende Teil b) eine verzweigte Kette aus Phosphateinheiten aufweist, die unterbrochen sind von Alkyleinheiten, die die Einheiten b1) als verzweigung innere Einheiten und die Einheiten b2) verzweigungs äußere Einheiten, d.h. am Ende der verschiedenen Zweige der Verzweigung, umfassen.

6. Nukleinsäuresonde nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie der allgemeinen Formel XX entspricht



07.10.88

in der

in der Sequenz S,

J die Bedeutung H oder OH hat,

B eine Nuklein- Purin- oder Pyrimidin-säurebase bedeutet, je nach den Nukleotiden veränderbar,

x die Zahl der Nukleotide von 1 bis 1.000 darstellt,

n, n' und n'' gleich 1 bis 20 sind,

M den Marker bedeutet, dessen Verzweigungsgrad Werte von 2 bis 128 annehmen kann, z.B. 8, wobei der höhere Grad immer das Doppelte des Vorhergehenden ist;

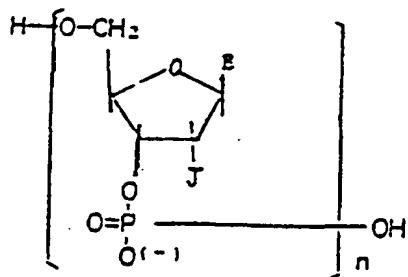
x den eigentlichen Marker bezeichnet, der entweder ein direkter Marker sein kann, wobei er aus den Enzymen wie alkalischer Phosphatase, Peroxidase und Fluorescein ausgewählt ist, die in der Lage sind, in Gegenwart eines Substrats eine Färbung oder Licht zu erzeugen,

oder ein indirekter Marker sein kann, wobei er aus den Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenin ausgewählt ist, die in der Lage sind, durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkannt zu werden.

7. Verfahren zur Herstellung von Sonden der Formel Ia, wie in Anspruch 4 definiert, umfassend

A1) die Synthese einer Nukleinsäuresequenz S

07.10.93



in der B und J und n die in Anspruch 4 angegebenen Bedeutungen haben,

durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger,

und

A2) die Fixierung eines Markers,
dadurch gekennzeichnet, daß für die Fixierung des Markers die Sequenz, vorzugsweise nach demselben Syntheseverfahren, insbesondere auf einem festen Träger,

entweder einer Verlängerung an ihrem 5' (OH)-Ende durch eine Reihe von Einheiten M und L

oder einer Verlängerung an ihrem 3' (OH)-Ende durch eine Reihe von Einheiten M und L

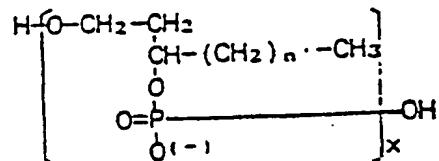
oder einer Verlängerung an ihrem 5' (OH)- und ihrem 3' (OH)-Ende durch zwei Reihen von Einheiten M und L,

unterzogen wird,

wobei M und L wie in Anspruch 4 definiert sind,

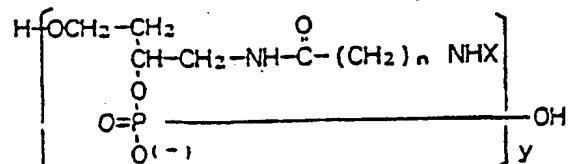
07.10.06

B) die Einheiten L jeweils durch Synthese eines nichtnukleotiden Polymers



erhalten werden, wobei n' und x die in Anspruch 4 angegebenen Bedeutungen haben,

C) die Einheiten M jeweils durch Synthese eines nichtnukleotiden Polymers



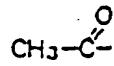
erhalten werden, wobei n und y die in Anspruch 4 angegebenen Bedeutungen haben,

und

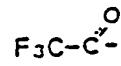
X entweder einen Marker wie alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluorescein, Biotin, Digoxigenin, jedes Hapten, das durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkennbar ist, oder eine Schutzgruppe für die primäre Aminfunktion, die nach der Gesamtsynthese der Nukleinsäuresonde entfernt wird,

07.10.90

zum Beispiel eine Acetylgruppe (VI), eine Tri-fluoracetylgruppe (VII) oder eine Benzoylgruppe (VIII):



VI



VII



VIII

darstellt,

und die obigen Synthesen B und C insbesondere durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger, durchgeführt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7 zur Herstellung einer Sonde, aufgebaut durch eine Oligonukleotidkette, die bei 5' (OH) ein Geflecht chemischer Zweige, die von Aminzweigen unterbrochen sind, trägt, verwendbar für den Nachweis von ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren, gekennzeichnet durch die Verfahrensschritte
 - Synthetisieren einer Oligonukleotidkette, deren Phosphatfunktionen und Basen geschützt sind, auf einem festen Träger;
 - Kondensieren einer Reihe von Entwicklungsderivaten für chemische Zweige und Aminzweige am 5' (OH)-Ende der Kette unter Verwendung der gleichen Kondensationszyclole, wie für die Oligonukleotidkettensynthese;
 - Abtrennen der 5'-modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger;
 - Entfernen des Schutzes der Basen und Phosphate der Kette;

07.10.98

- Einführen des Teils, der die für den Nachweis verantwortliche Reaktivität bereitstellt, an den primären Amingruppen.

9. Verfahren nach Anspruch 7 zur Herstellung einer Sonde, aufgebaut durch eine Oligonukleotidkette, die bei 3' (OH) ein Geflecht chemischer Zweige, die von Aminzweigen unterbrochen sind, trägt, verwendbar für den Nachweis von ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren, gekennzeichnet durch die nachfolgenden Verfahrensschritte

- Kondensieren von Entwicklungsderivaten für chemische Zweige und Aminzweige auf einem festen Träger, nach gemäß den gleichen Kondensationszyklen, wie für die Nukleinsäuresynthese, um eine gewünschte Sequenz von chemischen Zweigen und Aminzweigen zu bilden,
- Aufbauen einer Oligonukleotidkette anschließend an diese Sequenz, um so eine 3' (OH)-modifizierte Oligonukleotidkette zu erhalten, deren Phosphatfunktionen und Basen geschützt sind,
- Abtrennen dieser modifizierten Kette vom festen Träger,
- Entfernen des Schutzes der Phosphate und Basen,
- Einführen des Teils, der die für den Nachweis verantwortliche Reaktivität bereitstellt, an den primären Aminfunktionen.

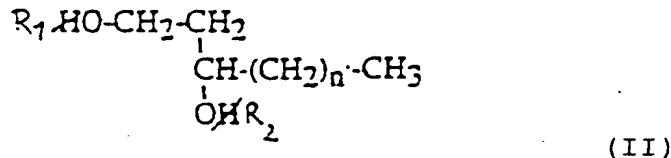
10. Verfahren nach Anspruch 7 zur Herstellung von Sonden mit einer Oligodesoxyribonukleotidkette, die bei 3' (OH) und bei 5' (OH) ein Geflecht chemischer Zweige, die von Aminzweigen unterbrochen sind, trägt, verwendbar für den Nach-

07.10.90

weis von ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren, gekennzeichnet durch die Verfahrensschritte

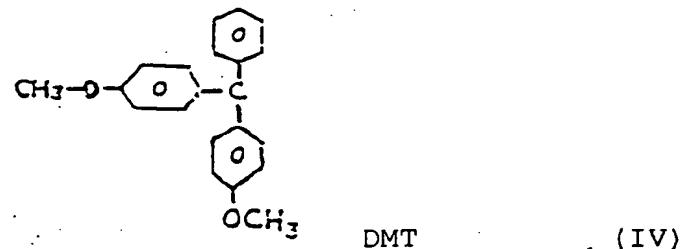
- Kondensieren von Entwicklungsderivaten für chemische Zweige und Aminzweige auf einem festen Träger gemäß den gleichen Kondensationszyklen, wie für die Nukleinsäure-synthese, um eine gewünschte Sequenz von chemischen Zweigen und Aminzweigen zu bilden,
- Aufbauen einer an ihrem modifizierten 3' (OH)-Ende fixierten Oligonukleotidkette anschließend an diese Sequenz, deren Phosphatfunktionen und Basen geschützt sind,
- Aufbauen einer Sequenz aus chemischen Zweigen und Aminzweigen am 5' (OH)-Ende der Oligonukleotidkette,
- Abtrennen der bei 3' (OH) und bei 5' (OH) modifizierten Oligonukleotidkette von ihrem festen Träger, Entfernen des Schutzes der Phosphate und Basen und
- Einführen des Teils, der die für den Nachweis verantwortliche Reaktivität bereitstellt, an den primären Aminfunktionen.

11. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Element des chemischen Zweigs L durch Kondensation einer Verbindung der Formel



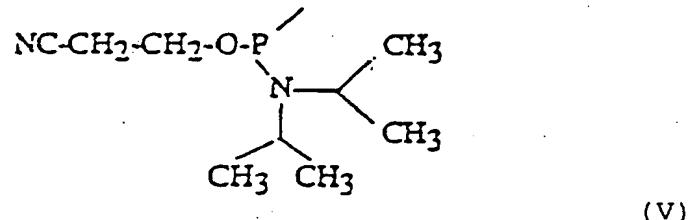
eingeführt wird, worin R_1 eine 4,4'-Dimethoxytritylgruppe (abgekürzt DMT) der Formel

07.10.68

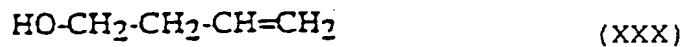


darstellt und worin R_2 eine phosphorylierte, gegebenenfalls geschützte Gruppe darstellt, die zur Einführung in eine Verbindung II (Synthon) am Ende eines Nukleotids oder eines bereits vorhandenen Synthons geeignet ist,

und insbesondere R_2 eine Diisopropylaminocyanoethoxyphosphin- oder Cyanoethoxydiisopropylaminophosphoramidit-Gruppe ist mit der Formel

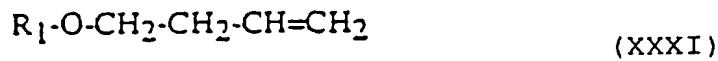


12. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß jeder Marker oder jede Nachweiseinheit M ausgehend von 3-Buten-1-ol der Formel



erhalten wird durch die Schritte:

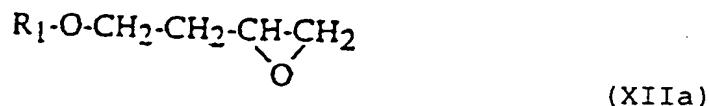
a) Schutz der primären Alkoholfunktion mittels einer Schutzgruppe R_1 , um eine Verbindung der Formel



07.10.96

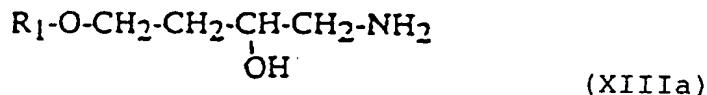
zu erhalten,

b) Epoxidierung der Doppelbindung der Verbindung (XXXI) um eine Verbindung der Formel



zu bilden,

c) Öffnen des Epoxids mit Ammoniak, um eine Verbindung der Formel



zu bilden,

d) Schutz der primären Amingruppe einer Verbindung der Formel



um eine Verbindung der Formel

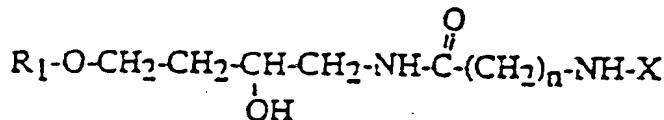


zu bilden, worin X die in Anspruch 7 angegebenen Bedeutungen hat,

e) Aktivierung der Verbindung (XXXIII),

f) Kondensation der Verbindungen (XIIIa) und (XXXIII) miteinander, um eine Verbindung der Formel

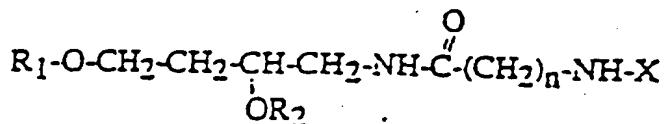
07.10.98



(XVa)

zu bilden, und

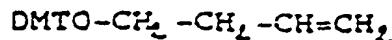
g) Phosphorylierung der Verbindung (XVa), um eine Verbindung der Formel



(III)

zu bilden, in der R₂ eine phosphorylierte Gruppe darstellt, die für die Einführung der Verbindung IIIa (Synthon) am Ende eines Nukleotids (3' und/oder 5') oder am Ende eines bereits vorhandenen Synthons geeignet ist.

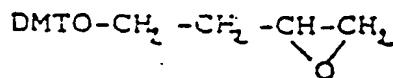
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) R₁ 4,4'-Dimethoxytrityl (abgekürzt DMT) bedeutet und der Schutz der primären Alkoholfunktion mittels 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl) durchgeführt wird, um eine Verbindung der Formel



(XXXIa)

zu erhalten,

in Schritt b) die Epoxidierung mit m-Chlorperbenzoësäure durchgeführt wird, um eine Verbindung der Formel

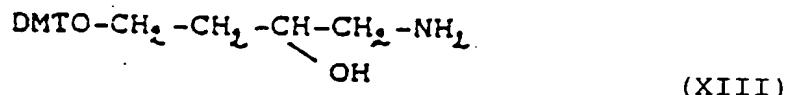


(XII)

07.10.98

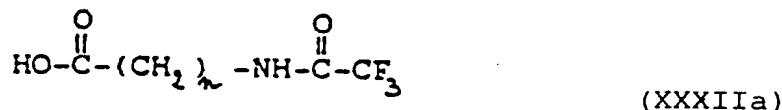
zu bilden,

in Schritt c) die Öffnung des Epoxids mit Ammoniak durchgeführt wird, um eine Verbindung der Formel



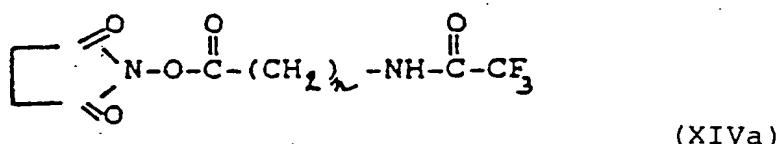
zu bilden,

in Schritt d) der Schutz der primären Aminogruppe der Verbindung (XXVI) mit einer Trifluoracetylgruppe durchgeführt wird, um eine Verbindung



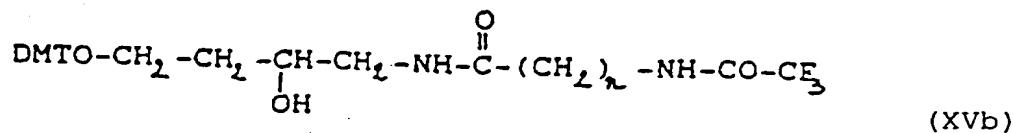
zu bilden,

in Schritt e) die Verbindung (XXXIIa) mit N-Hydroxysuccinimid aktiviert wird, um die Verbindung



zu bilden,

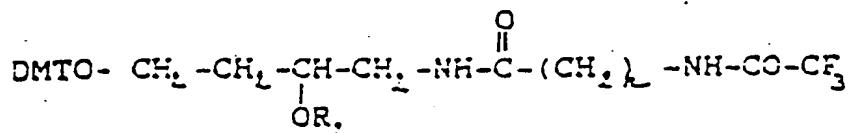
in Schritt f) die Verbindungen (XIII) und (XIVa) kondensiert werden, um eine Verbindung der Formel



zu bilden,

07.10.86

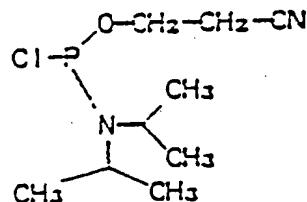
in Schritt g) die Verbindung (XVb) phosphoryliert wird, um eine Verbindung der Formel



(IIIa)

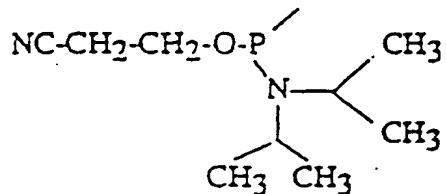
zu erhalten, in der R_3 eine phosphorylierte, gegebenenfalls geschützte Gruppe darstellt, die zur Einführung der Verbindung oder des Synthons (IIIa) am Ende eines Nukleotids oder eines bereits auf einem für einen vorgegebenen Internukleotidverbindungs-Synthesetyp verwendbaren festen Träger kondensierten Synthons geeignet ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, das bei der Synthese der Phosphoramidite verwendet wird, dadurch gekennzeichnet, daß das im Schritt g) verwendete Phosphorylierungsmittel das Diisopropylaminocyanoethoxychlorophosphin der Formel



XI

ist, so daß in der am Ende dieses Schritts erhaltenen Verbindung der Formel III R₂ eine Diisopropylamino-cyanoethoxyphosphino- oder Cyanoethoxydiisopropylamino-phosphoramidit-Gruppe mit der Formel



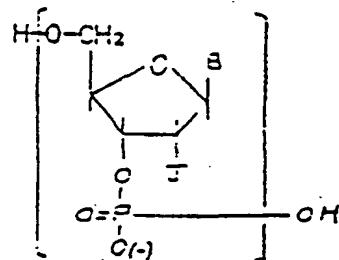
(V)

07.10.96

ist.

15. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß in den Formeln (XXXIIa, XIVa, XVb und IIIa) n gleich 5 ist.

16. Verfahren zur Herstellung von Sonden der Formel XX, wie sie in Anspruch 6 definiert sind, umfassend die Synthese einer Nukleinsäuresequenz S



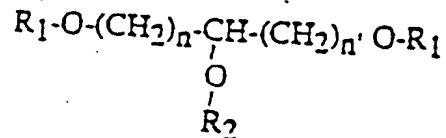
in der B und J die zuvor in Anspruch 4 angegebenen Bedeutungen haben, durch jedes bekannte manuelle oder automatische Internukleotidverbindungs-Syntheseeverfahren, bevorzugt auf einem festen Träger,

und die Fixierung eines Markers,

dadurch gekennzeichnet, daß für die Fixierung des Markers die Sequenz, vorzugsweise mit demselben Syntheseeverfahren, insbesondere auf einem festen Träger, an ihrem 5' (OH)-Ende durch einen Marker M, wie in Anspruch 6 definiert, verlängert wird, der eine verzweigte molekulare Struktur bildet, von der die Endzweige jeweils eine primäre Aminfunktion tragen.

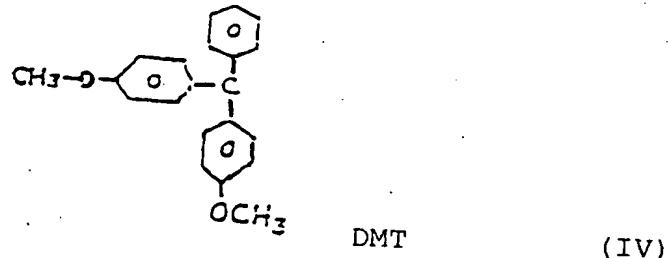
17. Verfahren nach Anspruch 16 zur Herstellung einer Sonde, aufgebaut aus einer Oligonukleotidkette, die bei 5' (OH) ein verzweigtes Geflecht von Alkylketten, die in Aminketten enden, trägt, verwendbar für den Nachweis von ADN-Sequenzen durch nichtradioaktive Verfahren, gekennzeichnet durch die Verfahrensschritte

- a) Synthetisieren einer Oligonukleotidkette, deren Phosphatkationen und Basen geschützt sind, auf einem festen Träger;
- b) Kondensieren einer Reihe von Verbindungen der Formel



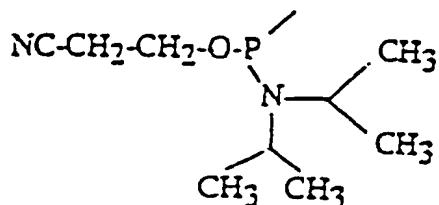
XXI

am 5' (OH)-Ende der Kette, worin R_1 4,4'-Dimethoxytrityl (abgekürzt DMT) der Formel



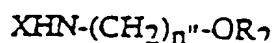
bedeutet, und R_2 eine phosphorylierte Gruppe darstellt, die zur Einführung der Verbindung XXI (Synthon) am Ende eines Nukleotids oder eines bereits vorhandenen Synthons geeignet ist, was zu n primären Alkoholstellen als Kondensationsstellen führt, und insbesondere R_2 eine Diisopropylaminocyanoethoxyphosphin- oder Cyanoethoxydiisopropylaminophosphoramidit-Gruppe ist mit der Formel

07.10.90



(V)

c) Durchführen einer Endkondensation über die erzeugten n Kondensationsstellen einer Verbindung der Formel

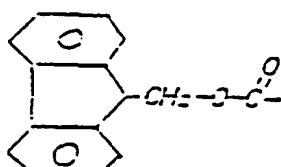
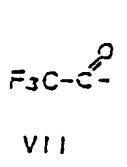


(XXII)

in der

R_2 die oben angegebenen Bedeutungen hat und X entweder einen Marker: alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluorescein, Biotin, Digoxigenin, jedes Haptén, das durch nichtisotopisch markierte Antikörper erkennbar ist,

oder eine Übergangsschutzgruppe für die primäre Aminfunktion, die nach der Gesamtsynthese der Nukleinsäureonde XX entfernt wird, darstellt; beispielsweise kann in diesem Syntheseansatz X ein Trifluoracetyl VII oder Fluorenylmethoxycarbonyl XXIII darstellen



XXIII

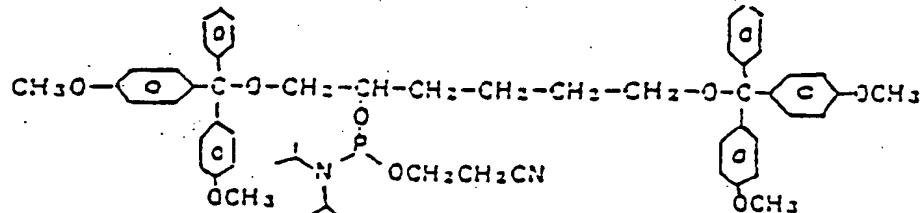
wobei die Kondensationen der Verbindungen XXI und XXII dieselben Reaktionszyklen wie für die Oligonukleotidsequenzsynthese verwenden,

07.10.88

d) Entfernen des Schutzes der Basen und Phosphate der Oligonukleotidkette und

e) Einführen des Teils, der die für den Nachweis verantwortliche Reaktivität bereitstellt, auf der Ebene der primären Aminogruppen.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß in der Verbindung XXIa n gleich 1, n' gleich 4 und R₂ eine Cyanoethoxydiisopropylaminophosphoramidit-Gruppe ist, so daß die hergestellte Verbindung XXIa der Formel

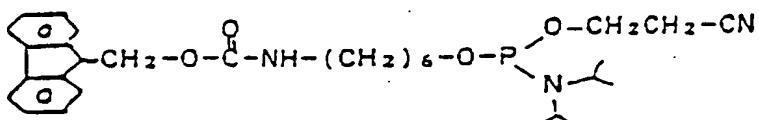


47

entspricht.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß in der Verbindung XXII die Gruppe R₂ eine Cyanoethoxydiisopropylaminophosphoramidit-Gruppe ist und X eine Fluorenylmethoxycarbonylgruppe und n'' gleich 6 ist,

so daß die hergestellte Verbindung XXII der Formel

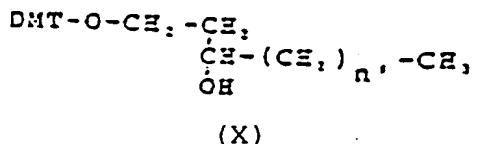


48

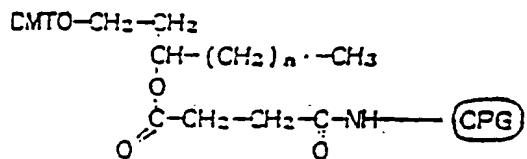
07.10.90:

entspricht.

20. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 7 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von in 3' (OH) markierten Oligonukleotiden das CPG durch eine Verbindung der Formel



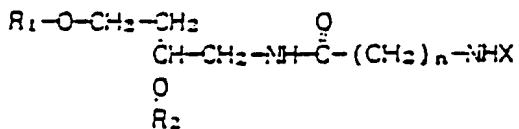
funktionalisiert ist, in der DMT und n' die in den Ansprüchen 7 bis 11 angegebenen Bedeutungen haben, so daß nach der Funktionalisierung der Träger der Formel



XIX

entspricht.

21. Als Zwischenprodukte für die Herstellung der Marker M verwendbare Verbindungen der Formel



(III)

in der

n eine ganze Zahl von 2 bis 20 darstellt,

R₁ eine Schutzgruppe für die primäre Alkoholfunktion ist, und

R₂ H oder jede phosphorylierte, gegebenenfalls geschützte Gruppe darstellt, die zur Einführung des

07.10.88

Synthons III am Ende eines Nukleotids oder eines bereits auf einem für einen vorgegebenen Internukleotidverbindungs-Synthesetyp verwendbaren festen Träger kondensierten Synthons geeignet ist,

und

irgendeinen Marker oder eine Übergangsschutzgruppe für die primäre Aminfunktion, die nach der Gesamtsynthese der Nukleinsäuresonde entfernt wird, darstellt.

22. Verbindungen nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß

R_1 eine im sauren Milieu labile 4,4'-Dimethoxytritylgruppe (abgekürzt DMT) darstellt, und

R_2 eine Cyanoethoxydiisopropylaminophoramidit-Gruppe darstellt.

23. Verbindungen nach den Ansprüchen 21 und 22, dadurch gekennzeichnet, daß

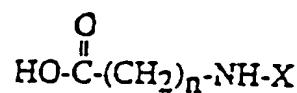
eine Acetyl-, Trifluoracetyl- oder Benzoylgruppe darstellt.

24. Verfahren zur Herstellung der Zwischenverbindungen der Formel III, wie in Anspruch 21 definiert, dadurch gekennzeichnet, daß es von einem 3-Buten-1-ol der Formel



ausgeht, das nacheinander den Schritten: Schutz der primären Alkoholfunktion, Epoxidierung der Doppelbindung, Öffnung des Epoxids, Kondensationsreaktion mit einer Verbindung der Formel

07.10.96



(XXXIII)

und Phosphorylierung des Kondensationsprodukts, wie in Anspruch 12 beschrieben, vorzugsweise mit den in den Ansprüchen 13 bis 15 beschriebenen Besonderheiten, unterzogen wird.

1 07.10.68

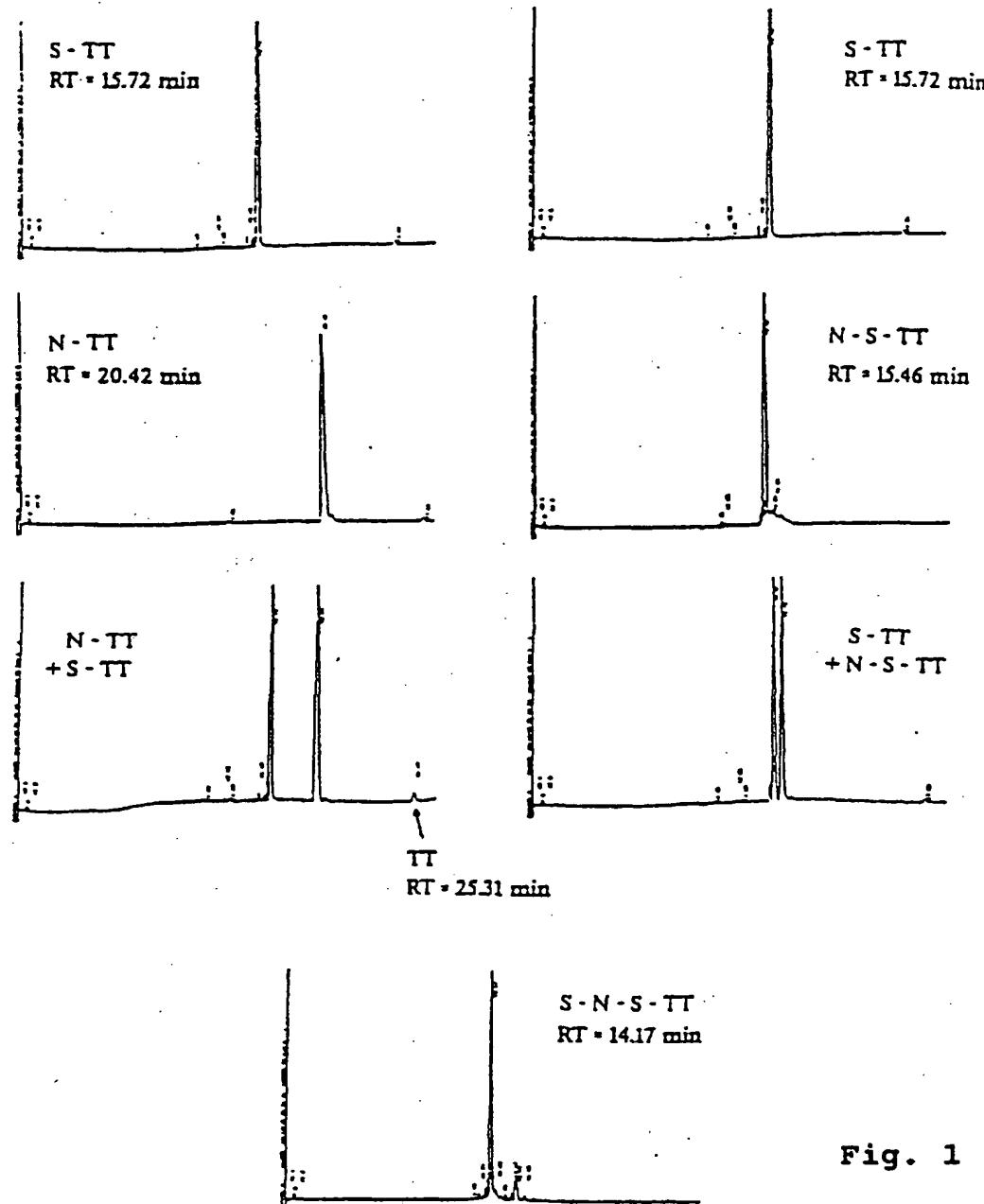
Reaktivität des Aminzweigs

Fig. 1

2 07.10.98

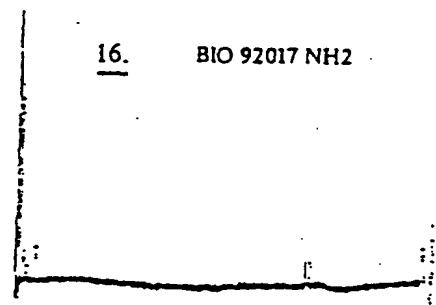
Oligo 23 mer mit Aminzweigen in 5'OH

5'N⁶SS-OLIGO

5'N⁶SSN⁶SS-OLIGO

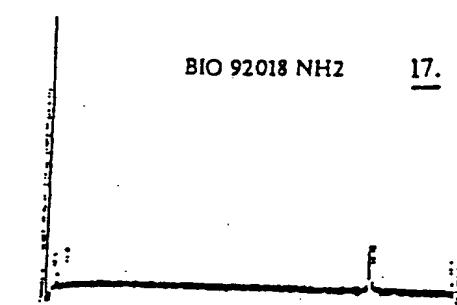
16.

BIO 92017 NH₂



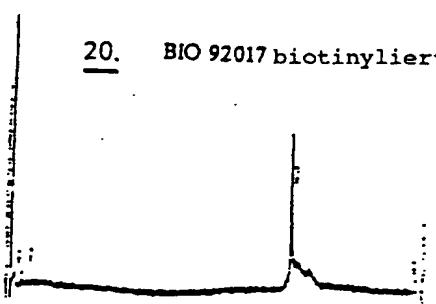
BIO 92018 NH₂

17.

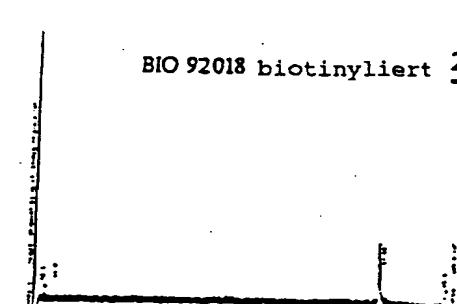


20.

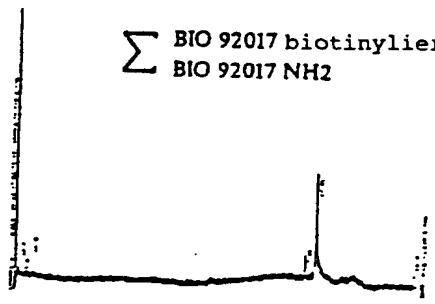
BIO 92017 biotinyliert



BIO 92018 biotinyliert 21.



\sum BIO 92017 biotinyliert
BIO 92017 NH₂



\sum BIO 92018 biotinyliert
BIO 92018 NH₂

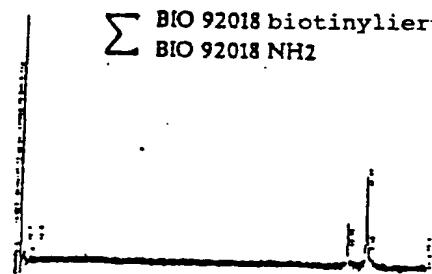
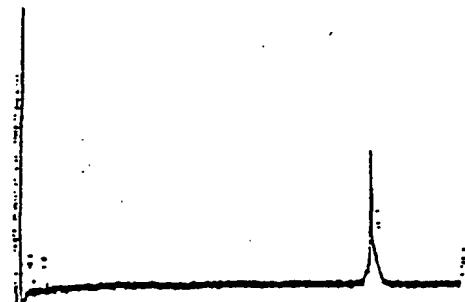


Fig. 2a

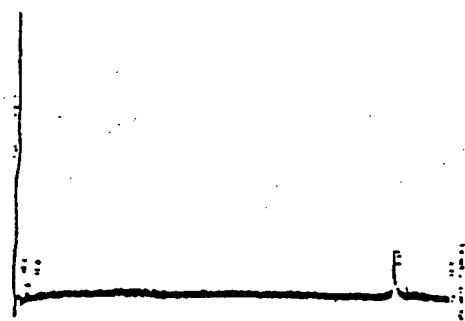
3 07.10.88

oligo 23 mer mit Aminzweigen in 5'OH

5'N³SSN⁵SSN³SS-OLIGO



BIO 92019 NH₂



BIO 92019 biotinyliert



\sum BIO 92019 biotinyliert
BIO 92019 NH₂

Fig. 2b

4 07.10.80

Versuch mit CPG, funktionalisiert mit "S",
Zweig "N" jeweils 0,1 M

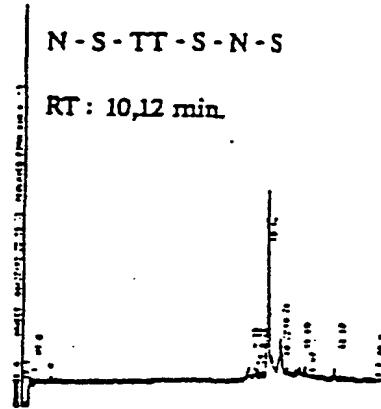
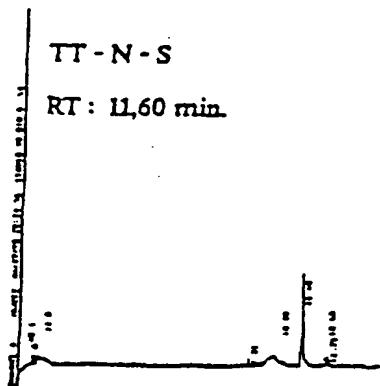
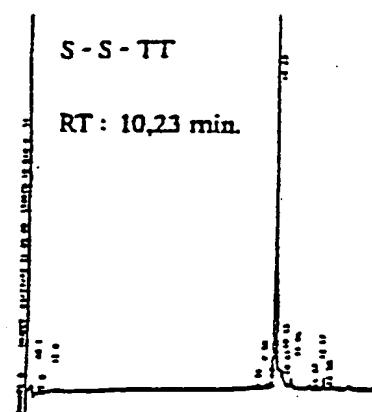
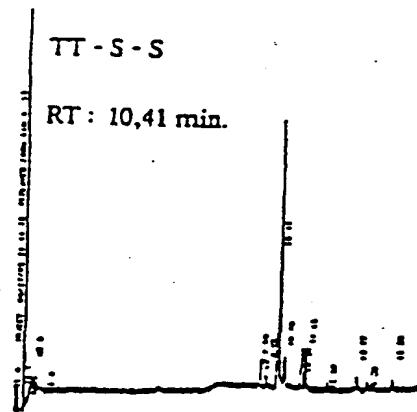


Fig. 3

5 07-10-68

In 3'OH biotinylierte Oligonukleotide

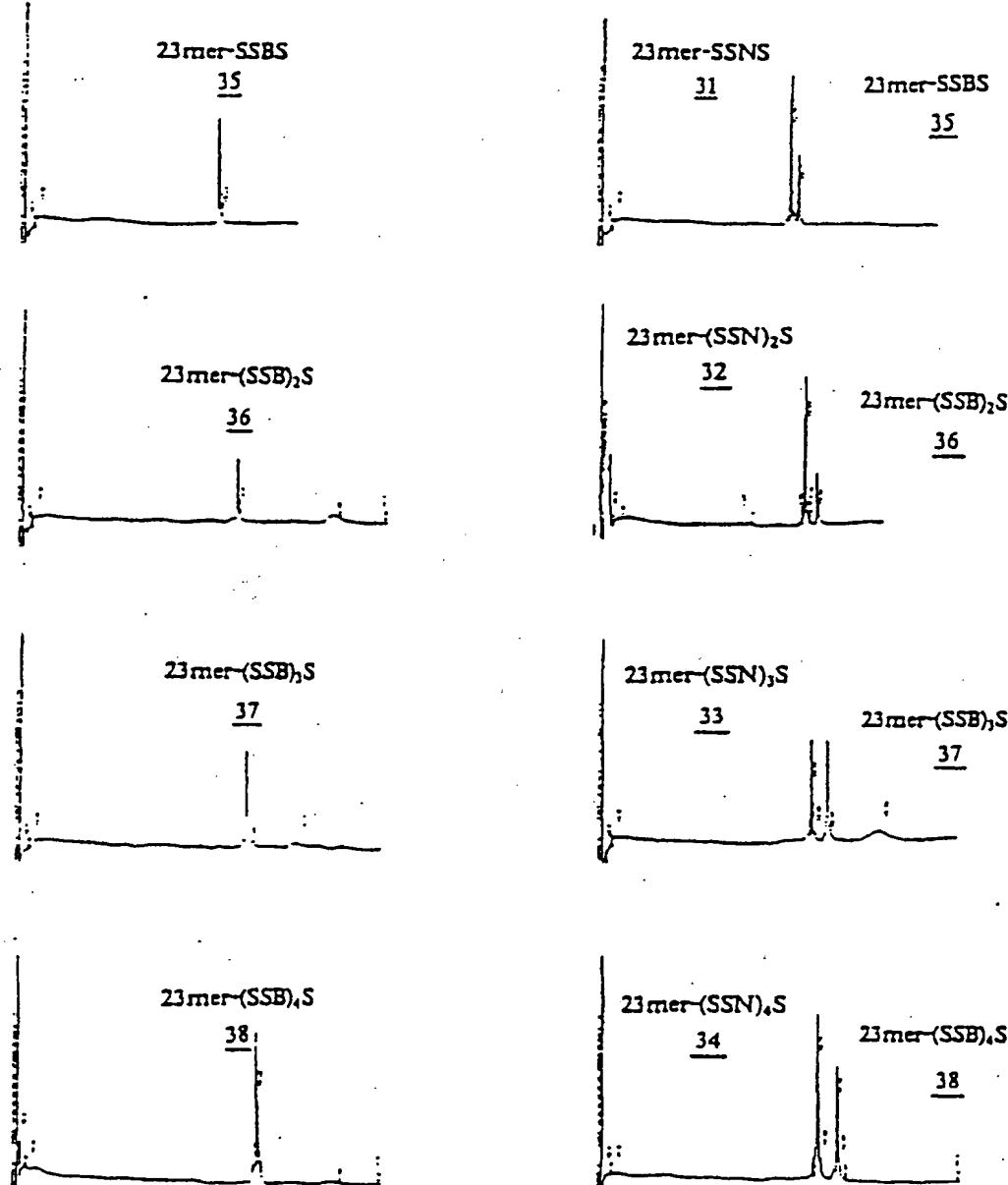


Fig. 4

6 07.10.96

In 3' und 5' OH biotinylierte Oligonukleotide

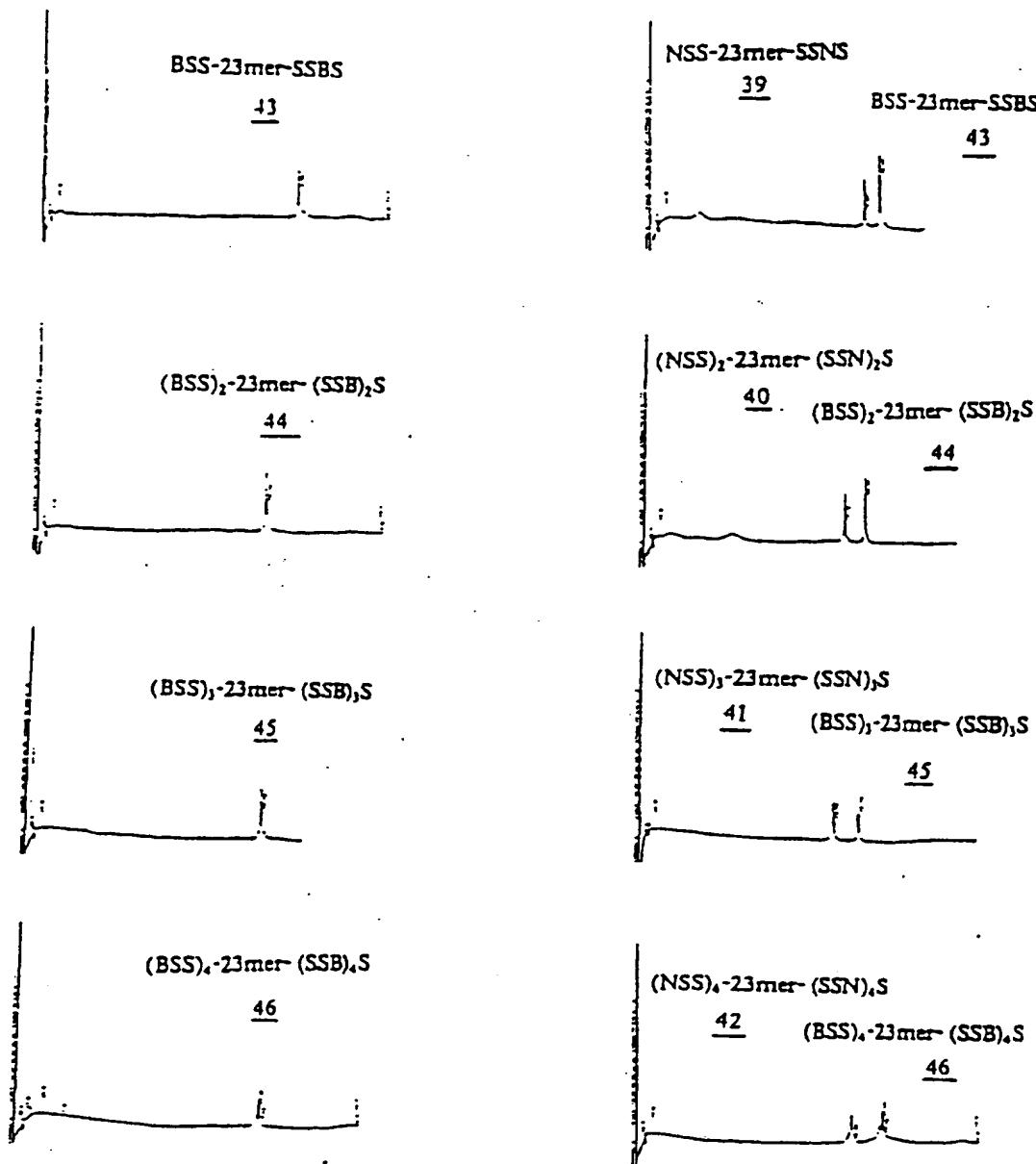


Fig. 5

07-1060

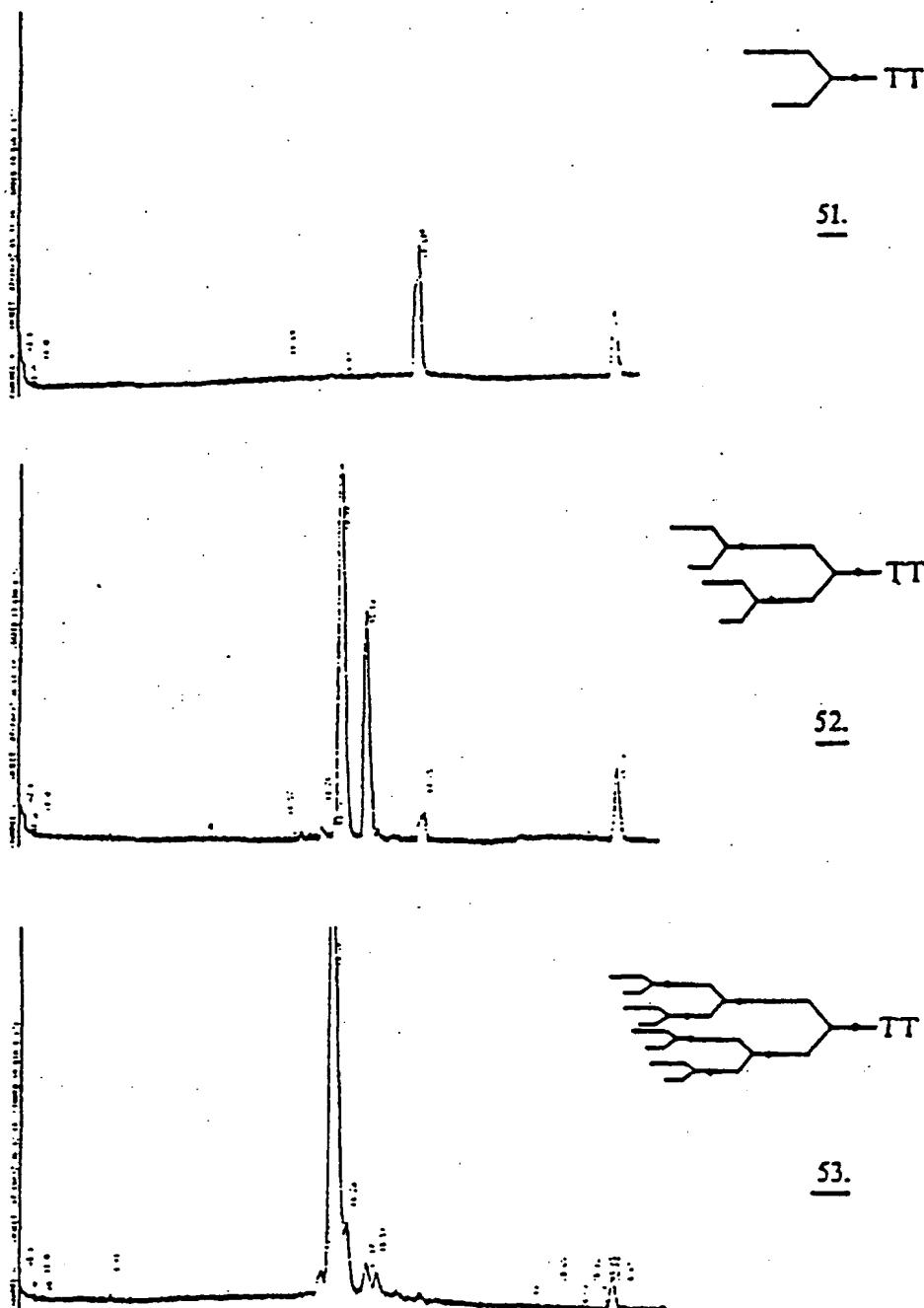


Fig. 6

8/07/10 90

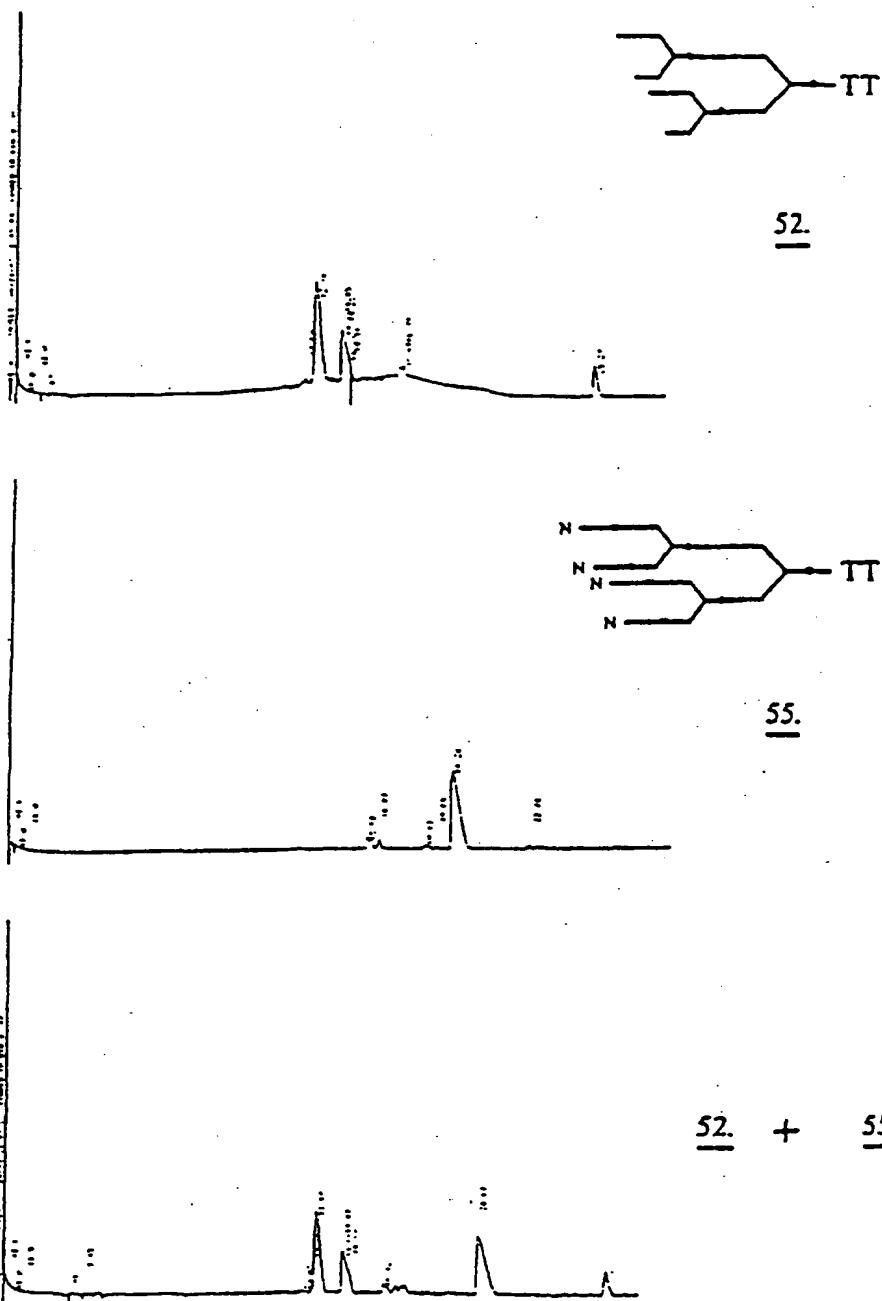


Fig. 7

07.10.08

Kandelaberstrukturen

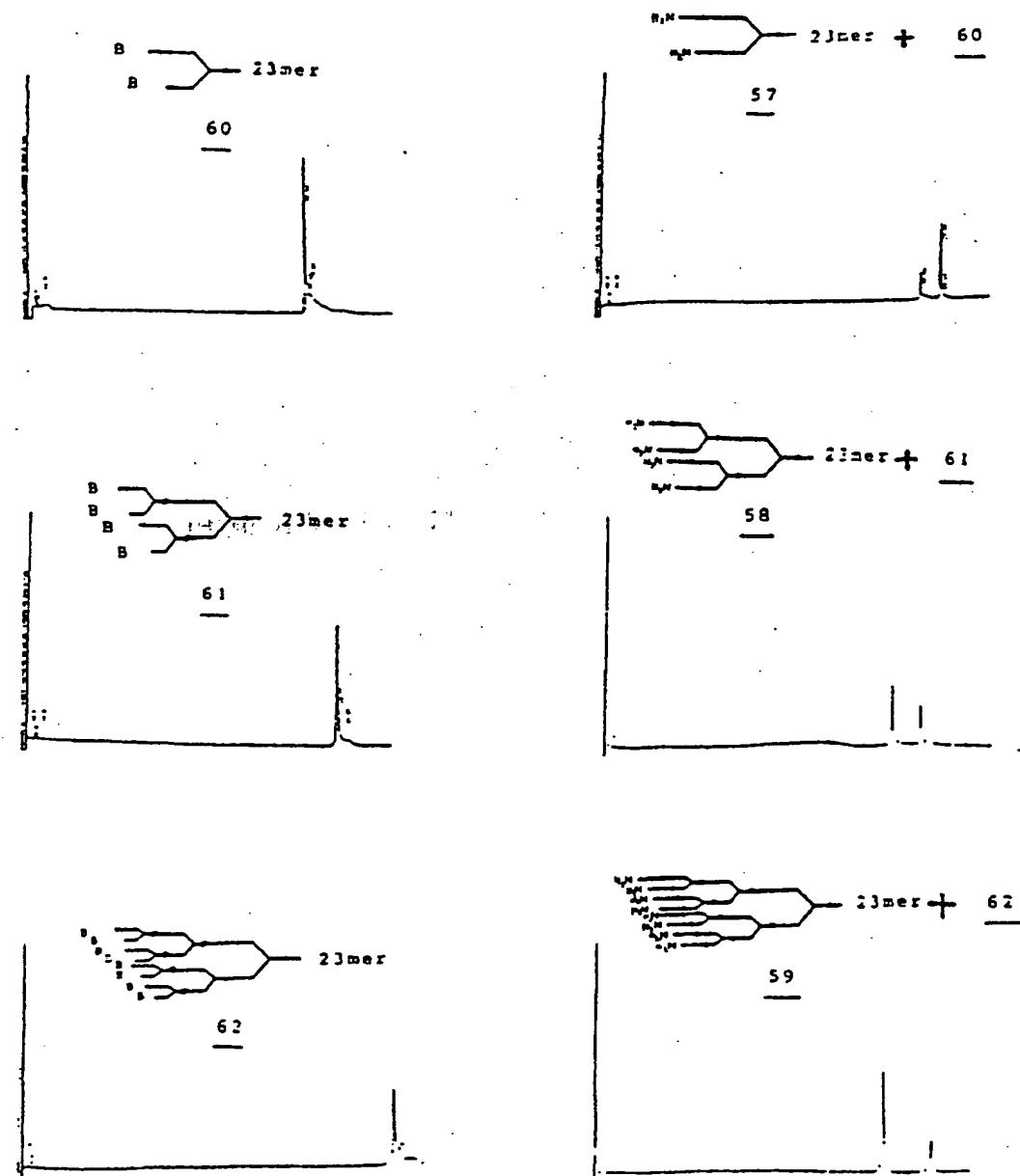


Fig. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)